A los lectores

El programa de monografías científicas es una faceta de la vasta labor de la Organización de los Estados Americanos, a cargo del Departamento de Asuntos Científicos y Tecnológicos de la Secretaría General de dicha organización, a cuyo financiamiento contribuye en forma importante el Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico.

Concebido por los Jefes de Estado Americanos en su Reunión celebrada en Punta del Este, Uruguay, en 1967, y cristalizado en las deliberaciones y mandatos de la Quinta Reunión del Consejo Interamericano Cultural, llevada a cabo en Maracay, Venezuela, en 1968, el Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico es la expresión de las aspiraciones preconizadas por los Jefes de Estado Americanos en el sentido de poner la ciencia y la tecnología al servicio de los pueblos latinoamericanos.

Demostrando gran visión, dichos dignatarios reconocieron que la ciencia y la tecnología están transformando la estructura económica y social de muchas naciones y que, en esta hora, por ser instrumento indispensable de progreso en América Latina, necesitan un impulso sin precedentes.

El Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico es un complemento de los esfuerzos nacionales de los países latinoamericanos y se orienta hacia la adopción de medidas que permitan el fomento de la investigación, la enseñanza y la difusión de la ciencia y la tecnología; la formación y perfeccionamiento de personal científico; el intercambio de informaciones, y la transferencia y adaptación a los países latinoamericanos del conocimiento y las tecnologías generadas en otras regiones.

En el cumplimiento de estas premisas fundamentales, el programa de monografías representa una contribución directa a la enseñanza de las ciencias en niveles educativos que abarcan importantísimos sectores de la población y, al mismo tiempo, propugna la difusión del saber científico.

La colección de monografías científicas consta de cuatro series, en español y en portugués, sobre temas de física, química, biología y matemática. Desde sus comienzos, estas obras se destinaron a profesores y alumnos de ciencias de los primeros años de la universidad; de éstos se tiene testimonio de su buena acogida.

El Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos agradece a los doctores Rodolfo Ertola, Osvaldo Yantorno y Carlos Mignone, autores de esta monografía, y a quienes tengan el interés y buena voluntad de contribuir a su divulgación.

VISIT…

INDICE

Prólogo iv

INTRODUCCION 1

CAPITULO 1
- Definiciones y áreas de aplicación 4
- Definiciones 4
- Areas de Aplicación 6
- Símbolos y unidades 6

CAPITULO 2
- Aspectos generales de los procesos de fermentación 8
- Efectores internos y externos 8
- Esquema de un proceso industrial 10

CAPITULO 3
- Selección, mantenimiento y mejoramiento de microorganismos de interés industrial 13
- Selección 13
- Mantenimiento o conservación de los cultivos 15
- Mejoramiento de microorganismos industriales 18
- Obtención de nuevas cepas por ingeniería genética 25

CAPITULO 4
- Medios de fermentación 31
- Requerimientos nutricionales 31
- Disponibilidad de los componentes 33
- Materias primas fundamentales 34
- Formulación 35
- Optimización 37
- Esterilización 37

CAPITULO 5
- Crecimiento microbiano 43
- Estequiometría de crecimiento 43
- Cinética de crecimiento 49
- Consumo de sustrato 50
- Mantenimiento celular 51
- Requerimiento de oxígeno 51
- Efecto de pH y la temperatura sobre el crecimiento 53

CAPITULO 6
Formación de producto 55

CAPITULO 7
Sistemas de cultivo y aspectos generales de bioreactores 60
Sistemas de cultivo 60
Cultivo continuo 61
Batch alimentado 64
Batch 67
Bioreactores 70

CAPITULO 8
Producción de levadura de purificación 73
Introducción 73
Cepas y medios de mantenimiento empleados 73
Requerimientos nutricionales 74
Cinética de crecimiento y rendimientos 75
Producción comercial 76

CAPITULO 9
Producción de Penicilina 82
Introducción 82
Cepas, medios de mantenimiento e inóculos 82
Requerimientos nutricionales y específicos 84
Parámetros de producción 85
Tecnología del proceso 87
Economía del proceso 90

CAPITULO 10
Tratamiento de efluentes 92
Aspectos fundamentales 93
Diferencias entre tratamientos biológicos de efluentes y procesos de fermentación..... 97
Métodos de tratamiento 99
Metodología para la determinación de la calidad de un efluente 100
Estrategia general para encarar el problema de los efluentes 101

CAPITULO 11
Posibilidades futuras 102

PROLOGO

El título `Microbiología Industrial" puede tener connotaciones un poco ambiguas, especialmente en medios académicos. Hay, lamentablemente, en todo el mundo universitario, una tendencia a separar dicotómicamente entre "ciencia pura" y "aplicaciones". De esto resulta por un lado la Ciencia, y por el otro las aplicaciones, sobre todo las industriales, presentadas como una serie de "recetas" basadas en empirismos.

Esta estructura conceptual es errónea, y más aún, nociva. Nada más erróneo que ignorar que las aplicaciones industriales requieren, para ser competitivas en el mundo actual, estar basadas en sólidos conocimientos. La solución de los problemas reales que generan el diseño y operación óptima de una moderna planta industrial basada en un proceso biológico, requiere lo más moderno del genio científico.

En ese sentido, esta monografía puede ser considerada una reivindicación de lo que debe ser la Microbiología Industrial. Tras ese título, que ha sido en el pasado mal interpretado y a veces despreciado, se esconde el desarrollo de una serie de temas que bien podrían ubicarse bajo títulos más de moda y de más "apeal", como biotecnología, ingeniería. bioquímica, etc. Se trata de las bases de la tecnología que en todo el mundo se está. desarrollando y traduciendo en logros industriales. La secuencia. de los capítulos indica., en realidad, el camino a seguir para el diseño de un proceso industrial biológico: desde la selección y mantenimiento de microorganismos, incluyendo referencias a. microorganismos recombinantes y a los principios básicos de los medios de fermentación. Se tratan luego los principios de estequiometría y cinética. microbiana, y se analiza los tipos de biorreactores disponibles. El trabajo termina con la presentación de tres ejemplos detallados de procesos microbiológicos: levadura, penicilina y tratamiento de efluentes.

Todo esto está presentado en una forma accesible, a pesar de reflejar en muchos aspectos los últimos avances en el conocimiento de los sistemas de producción bio-industriales.

El Dr. R. Ertola es, sin lugar a dudas, la persona que más impacto ha tenido en el desarrollo de la. ingeniería bioquímica en la Argentina, y los Dres. Mignone y Yantorno que fueron sus alumnos, son sus dignos sucesores: su esfuerzo manco-conocimiento en el tenia, y una. reivindicación de lo que debe ser entendido por Microbiología Industrial.

Prof. José Merchuk
Ben Gurion University
Beer Sheva, Israel

INTRODUCCION

Los microorganismos pueden ser considerados en términos generales con dos criterios que son antagónicos. Uno corresponde a las actividades útiles que tienen algunos para obtener bienes o servicios y otro completamente distinto corresponde a los efectos perjudiciales que ocasionan que están generalmente asociados a la producción de enfermedades, tanto en el hombre como en los animales, y que también se pueden extender al deterioro producido sobre alimentos y materiales diversos.

La Microbiología Industrial se ocupa fundamentalmente de las actividades útiles de los microorganismos.

El término microorganismo se aplica en esta monografía, con el mismo criterio que el utilizado por Palleroni, o sea a organismos tales como bacterias, hongos y levaduras, es decir procariotes y eucariotes con inclusión de algas microscópicas, pero que no comprende a los virus. Aunque existen aplicaciones industriales de los virus como es el caso de la producción de algunas vacunas esos procesos quedan excluídos de esta monografía.

Las aplicaciones de los microorganismos datan de tiempo inmemorial. El hombre hizo uso de ellos sin saber que éstos existían desde que inventó o descubrió al azar la manera de hacer cerveza, vinagre, vino o pan. La cerveza era conocida antes del 6000 a.C. por sumerios y babilonios, y en el antiguo Egipto existía ya verdadera producción en 1700 a.C.; el vinagre se producía desde antes de esa fecha y el vino es también muy antiguo, ya que existe evidencia de su producción antes del 2000 a.C. en Egipto y China, y finalmente el pan se conoce desde 4000 a.C. aproximadamente.

Se puede afirmar que hasta comienzos del siglo XX existe muy poco o ningún control de los procedimientos utilizados para la elaboración de esos productos o alimentos. En un análisis cronológico se pueden fijar 4 grandes etapas en el desarrollo de la Microbiología Industrial: 1) hasta 1900; 2) 1900-1945; 3) 1945-1979 y 4) 1979 hasta el presente, y considerar el comienzo del siglo como el inicio de cierto control en los procesos de utilización de cultivos puros.

A partir de 1900 comienza la etapa de producción de una serie de productos nuevos que se suman a los conocidos desde la más remota antigüedad, y que son la levadura de cerveza, glicerol, ácido láctico, acetona butanol y etanol.

Hasta el 1945 poco se esperaba del futuro de la Microbiología Industrial, ya que solamente unos pocos productos eran fabricados con microorganismos, y además varios de esos productos podían obtenerse por otras vías, ya más convenientes por razones económicas, como etanol, ácido láctico o acetona butanol.

Con el advenimiento de la penicilina en 1945 y la necesidad de su producción, se produce un impacto formidable sobre los procedimientos microbiológicos, ya que se plantea el desafío de la producción en gran escala en condiciones de mucho mayor control y con necesidad de operaciones más complejas para la separación y purificación de los productos. Como consecuencia de los avances logrados

en esos desarrollos se produce en pocos años la aparición de un gran número de nuevos productos, como otros antibióticos, aminoácidos, esteroides, enzimas, biomasa aplicada a la alimentación animal y humana (proteínas unicelulares), nucleótidos, etc.

A partir de 1979 la Microbiología Industrial recibe un nuevo y notable impulso que se suma al anterior cuando se concretan a nivel de procedimientos prácticos las posibilidades que ofrece la ingeniería genética, disciplina surgida como consecuencia del avance de la Biología Molecular. Este nuevo impulso posibilita la producción industrial, basada en la utilización de microorganismos recombinantes, de sustancias nuevas nunca producidas antes por esa vía como la insulina, hormona de crecimiento, interferón y otras de muy reciente aparición en el mercado de productos relacionados con el área de la salud.

Con la evolución cronológica comentada se fue también produciendo una evolución en los conceptos involucrados, ya que con el avance de los conocimientos y sobre todo con la necesidad de resolver problemas de producción vinculados a procesos cada vez más complejos, se fue haciendo necesaria la participación de ingenieros y bioquímicos además de los microbiólogos, y se fue produciendo también la integración de conocimientos provenientes de varias disciplinas. Se fue profundizando, por ejemplo, el estudio de los microorganismos de interés industrial, no sólo en sus aspectos microbiológicos, sino también en relación a los requerimientos surgidos de las aplicaciones industriales de los mismos. Se fue así diferenciando la metodología general empleada en la selección, mantenimiento y mejoramiento de los microorganismos, ya que estos aspectos debían orientarse a los productos de interés y al aumento de la productividad de las cepas empleadas. Lo mismo sucedió con los requerimientos :de los medios de producción que deben incluir consideraciones económicas además de las microbiológicas. En los aspectos tecnológicos se produjeron también evoluciones necesarias, ya que de las cubas clásicas de fermentación construídas de materiales diversos y con poca instrumentación se pasó a biorreactores de acero inoxidable muy instrumentados.

El desarrollo de los procesos en los reactores y la interacción microorganismo-medio que en los mismos requirió aportes fundamentales de la Bioquímica y Fisiología Microbiana, como el conocimiento de las rutas metabólicas, cinética enzimática, mecanismos de regulación y estudios acerca de la influencia del medio ambiente sobre la productividad del proceso. Con respecto a la Tecnología se incorporaron conocimientos fundamentales de fenómenos de transporte como transferencia de materia, calor y cantidad de movimiento y criterios de cambio de escala.

Por otra parte, y como consecuencia de la contribución de otras disciplinas básicas como la Química, se fueron incorporando también conceptos de termodinámica y estequiometría que se integraron con los de la cinética enzimática para ser aplicados al crecimiento microbiano y a la formación de productos. Con todos esos conceptos emanados de la Microbiología, Química, Bioquímica y Tecnología, se constituyeron las bases de la Microbiología Industrial actual.

La presente monografía considera esencialmente las bases de la Microbiología Industrial sin entrar en los aspectos ingenieriles, es decir trata de aquellos temas que corresponden al microorganismo como su selección, mantenimiento y mejoramiento, el diseño y formulación de los medios, estequiometría y cinética del crecimiento microbiano y de formación de producto y modos de operación de los reactores. Finalmente y como ejemplo de aplicación se consideran dos industrias típicas y el tratamiento de efluentes.

La Microbiología Industrial abarca, como ya dijimos, todos aquellos procesos que se realizan con microorganismos, y aunque conceptualmente pueden considerarse también procesos de fermentación a los que se realizan con microorganismos sin crecimiento, ya sea en suspensión o inmovilizados, esta monografía está limitada únicamente a los procesos con células en crecimiento, que son por otra parte los más importantes.

En Microbiología Industrial se utilizan los términos fermentación y fermentaciones industriales, para caracterizar a los procesos o tecnologías basados en el uso de microorganismos. El término "fermentación", que deriva del latín *fermentar* (hervir), inicialmente reservado a la actividad microbiana anaerobia, se fue aplicando asimismo a procesos aerobios y finalmente también a aquéllos que utilizan células animales y vegetales. En la actualidad se está haciendo muy general y se corre el peligro de no poder aplicarlo con precisión a un determinado tipo de proceso biológico. Nosotros preferimos conservar el término ya que está ampliamente divulgado, y por otra parte muy arraigado en todo el mundo. Es por ello que los procesos de la Microbiología Industrial o las fermentaciones industriales, o los procesos de fermentación, son o pueden considerarse como sinónimos, y es en ese sentido que serán empleados en esta monografía.

Con respecto a los símbolos y unidades empleados, que están considerados especialmente en el capítulo 1, se decidió emplear aquellos que son los más aceptados por la mayoría de los especialistas.

Es importante destacar que para la comprensión de los temas tratados es necesario que el lector tenga conocimientos generales de Microbiología, Química y Bioquímica, además de cierto nivel de conocimiento matemático. Es muy conveniente, por ejemplo, que el lector haya leído previamente las monografías de las series biológicas, como así también algunas correspondencias a temas de Química y Matemáticas ya publicados por la OEA. Finalmente y con objeto de facilitar al lector la posibilidad de ampliar los conocimientos sobre los temas tratados, se incluyen en cada capítulo algunas lecturas recomendadas.

Lecturas recomendadas:

1. *`Microorganismos".* I.M. Gutiérrez-Vázquez. Monografía N° *6.* Serie de Biología. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Departamento Asuntos Científicos. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. *1968.*
2. *"Principios generales de Microbiología".* N.J. Palletoni. Monografía N° *7.* Serie de Biología. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico Departamento de Asuntos Científicos. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. *1970.*

Capítulo 1

DEFINICIONES Y AREAS DE APLICACION

Definiciones

La Microbiología Industrial puede definirse diciendo que es la parte de la Microbiología que se ocupa de las aplicaciones industriales de los microorganismos. Desde otro punto de vista puede decirse también que los procesos de la Microbiología Industrial constituyen aquellos procesos industriales catalíticos basados en el uso de microorganismos.

Con el notable impulso de la Biotecnología producido en los últimos años y la inclusión y difusión de otros términos como biotecnología de avanzada, biotecnología moderna, biotecnología de punta, biotecnología recombinante o tecnología del DNA recombinante, biotecnología e ingeniería genética, biotecnología y microbiología industrial, y hasta biotecnología negativa, etc., se ha complicado la comunicación entre los distintos especialistas y la interpretación adecuada de los términos empleados. Para poder clarificar esos términos pensamos que es conveniente definir y delimitar los campos de la Biotecnología y de algunas disciplinas que la integran.

La Biotecnología es una actividad multidisciplinaria que comprende la aplicación de los principios científicos y de la Ingeniería al procesamiento de materiales por agentes biológicos para proveer bienes y servicios. Los agentes biológicos pueden ser células microbianas, animales, vegetales y enzimas. Se entiende por bienes a cualquier producto industrial relacionado con alimentos, bebidas, productos medicinales, etc., y por servicios a aquellos vinculados a la purificación de aguas y tratamiento de efluentes. Esta definición que es la más conocida y aceptada por la mayor parte de los paises fue propuesta por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD).

La Microbiología Industrial se ocupa de producción de bienes y servicios con células microbianas. Por lo tanto la Microbilogía Industrial representa una parte, seguramente la más importante, de la Biotecnología.

La Ingeniería genética comprende una serie de técnicas que permiten obtener un organismo recombinante, o sea portador de un gen extraño proveniente de otras células, sean éstas microbianas, vegetales o animales. Es una disciplina derivada de la Biología molecular que está incluida en la Biotecnología como herramienta fundamental para la obtención de microorganismos específicos a ser utilizados en la producción de bienes y servicios. El término tecnología del DNA recombinante puede considerarse sinónimo de Ingeniería genética.

Consideramos que los términos biotecnología de avanzada, biotecnología moderna, no son adecuados. Cualquier tecnología o biotecnología avanza y se moderniza. Si los términos se aplican a procesos con cepas de Ingeniería genética únicamente o a transplante de embriones o a micropropagación vegetal por cultivos de tejidos o a producción de especies vegetales mejoradas por cultivos de tejidos o a producción de especies vegetales mejoradas por cultivos de anteras, cte., pueden confundirse mucho los conceptos cuando con toda justicia podemos incluir también en la biotecnología de avanzada las nuevas tecnologías de producción de alcohol, ya que son más modernas o de avanzada con respecto a las anteriores. Si se desea hacer una diferencia, tal vez sería conveniente referirse a la

Tabla 1. Areas de aplicación y ejemplos de productos obtenidos por microorganismos.

AREA	MICROORGANISMOS	PRODUCTOS
SALUD	*Bordetella pertusis* *Clostridium tetani* *Corynebacterium diphteriae*	Vacuna triple
	Propionebacterium sp.	Vitamina B_{12}
	Penicillium chrysogenum	Penicilina, Estreptomicina,
	Streptomyces sp. varias	Tetraciclina y otros antibióticos
	Bacillus sp. *Rhizopus nigricans* *Curvularia lunata* *Aspergillus ochraceus*	Compuestos esteroidales
	E. coli recombinante	Interferon, Insulina
	Saccharomyces cervisiae Recombinante	Vacuna contra virus hepatitis B
ALIMENTOS	*Saccharomyces cervisiae*	Levadura de panificación
	Streptococcus lactis *Lactobacillus bulgaricus*	Yoghurt
	Saccharomyces sp. varios	Vino, Cerveza, Sidra
	Corynebacterium y *Brevibacterium* sp. varias y auxotróficas diversas	Acido glutámico y otros aminoácidos
	Acetobacter aceti	Vinagre
	Bacillus sp. varios	Saborizantes
	Blakeslea trispora *Streptomyces chrestomyceticus* *Dunaliella* sp.	Carotenoides
	Lactobacillus *Streptococcus* sp. varias *Penicillium* sp. varias	Quesos
PRODUCCION VEGETAL	*Rhizobium* sp. (varios)	Inoculantes de leguminosas
	Giberella fujikuroi	Acido giberélico (estimulante del crecimiento vegetal)
	Bacillus thuringiensis *Verticillium lecanii* *Metarhizium anisopliae*	Bioinsecticidas bacterianos y fúngicos
PRODUCCION ANIMAL	*Candida utilis*, y otros *Clostridium* (varios)	Proteína unicelular
	Paseurella multocida *Salmonella typhimurium* *Brucella abortus*	Vacunas
INSUMOS INDUSTRIALES	*Saccharomyces cervisiae* *Zymomonas* sp.	Etanol
	Clostridium acetobutilicum	Butanol, Acetona
	Bacillus sp. (varios)	Enzimas industriales
	Aspergillus (varios)	(amilasas, proteasas, celulasas,
	Trichoderma reseei	Glucosa isomerasa, pectinasas)
	Aspergillus niger	Acido Cítrico
	Aspergillus niger	Acido Glucónico
	Xanthomonas campestris	Goma Xantano
MINERIA	*Thiobacillus thioxidans* y otras sp.	Cobre, Uranio y otros
SERVICIOS	Especies aerobias y anaerobias varias	Efluentes purificados

Biotecnología tradicional o convencional para denominar a los procesos conocidos con anterioridad al advenimiento de la Ingeniería genética, y no convencional a los posteriores.

Areas de aplicación

Las áreas de aplicación de la Microbiología industrial son muy variadas y de ellas surge ha importancia y el impacto que tiene esta disciplina en la actualidad.

Las áreas principales son: salud, alimentos, producción vegetal y animal, insumos industriales, minería y servicios.

En primer lugar se debe destacar la importancia de la Microbiología Industrial en el mantenimiento de la salud y tratamiento de enfermedades, fundamentalmente por su aplicación en la producción de compuestos de actividad farmacológica y vacunas.

En la industria de alimentos es también significativa la aplicación de la Microbiología Industrial en la producción de bebidas, enzimas, saborizantes, productos lácteos, etc.

La producción agropecuaria se ve también favorecida en sus aspectos de producción vegetal y animal por un conjunto variado de procesos microbiológicos que se han enriquecido notablemente en los últimos años (como ha sucedido con otras áreas) con la utilización de técnicas de ingeniería genética.

El área de aplicación en minería está relacionada con la biolixiviación o sea con la aplicación de microorganismos en la extracción de metales de minerales de baja ley.

Finalmente el área de servicios se refiere fundamentalmente a la aplicación de microorganismos en la purificación de efluentes, aspecto fundamental para el mantenimiento de la calidad de vida.

Varios ejemplos de productos y microorganismos empleados en las distintas áreas de aplicación de la Microbiología Industrial se pueden observar enla Tabla 1.

Símbolos y unidades

Es conveniente emplear símbolos y unidades correspondientes al sistema internacional, pero es importante que sean aquellos que son utilizados por la mayoría de los investigadores y profesionales relacionados. La Sección de Biotecnología de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada estudió el problema y encomendó a una serie de expertos de varios países la confección de una lista de símbolos y unidades utilizadas. La lista fue sometida a la crítica de numerosos especialistas y fue finalmente publicada en inglés como guía general sobre símbolos y unidades en Biotecnología. Una traducción castellana adaptada a la nomenclatura en español fue también preparada y publicada posteriormente.

En la tabla 2 se dan algunos símbolos y unidades, expresados en el sistema internacional (SI) y también en unidades comunes en Microbiología Industrial, y que son las que utilizamos en esta monografía. Corresponde ahora, después de considerar los aspectos generales de los procesos fermentativos, tratar aquellos esenciales que corresponden a los microorganismos de interés industrial.

Tabla 2. Algunos símbolos y unidades empleadas en Microbiología Industrial.

Descripción y/o definición	Símbolo	Unidad S.I *	Unidades comunes
Dimensiones de volumen			
Volumen	V	m^3	1
Energía de activación	E	J mol^{-1}	cal mol^{-1}
Presión			
La presión parcial lleva subíndices apropiados como P_{O_2}, presión parcial de O_2	P	bar	atm
Rendimiento			
Relación general de masa que expresa salida con respecto a la entrada. Debe ser definido con subíndices como $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$	Y	–	–
Temperatura			
Absoluta	T	K	K
General	t	°C	°C
Tiempo			
Identificar los períodos mediante subíndices t_d para tiempo de duplicación, t_l para tiempo de latencia	t	s	min, h
Concentración			
Biomasa, concentración	X	Kg m^{-3}	g l^{-1}
Número total	N	–	–
Sustrato	S	Kg m^{-3}	mgl^{-1}, g l^{-1}
Producto	P	Kg m^{-3}	mg l^{-1}, g l^{-1}
Símbolos para conceptos de velocidad			
Crecimiento, velocidad	r_x	Kg m^{-3} sec^{-1}	g l^{-1} h^{-1}
Crecimiento, velocidad específica	μ	s^{-1}	h^{-1}, d^{-1}
Dilución, velocidad	D	s^{-1}	h^{-1}, d^{-1}
Flujo volumétrico o caudal	F	m^3 s^{-1}	l h^{-1}
Mantenimiento, coeficiente de Término no asociado al crecimiento relacionado con consumo de sustrato	m	s^{-1}	h^{-1}
Productividad			
Utilizar subíndices apropiados para biomasa r_x y r_p para producto	r	Kg m^{-3} s^{-1}	g l^{-1} h^{-1}

* S.I.: Sistema Internacional de Unidades.

Lecturas recomendadas:

1. Biotechnology. International Trends And Perspectives. A. Bull, G. Holt and M. Lilly. OECD. Paris, 1982.
2. Lista de Stntbolos con Unidades recomendadas para su entpleo en Biotecnologta. Traducción castellana, R. Ertola. Rev. Latinoam. Ing. Qufm. Vol. 16, N° 2, 5-12 (1986), del original inglés Pure and Appl. Chem. Vol. 54 N° 9, p. 1743-1745, (1982).

Capítulo 2

ASPECTOS GENERALES DE LOS PROCESOS DE FERMENTACION

Un proceso de fermentación típico es esencialmente un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos crecimiento y formación de producto, tienen lugar durante el desarrollo del proceso simultáneamente o no según los casos.

Efectores internos y externos

El comportamiento de un microorganismo en crecimiento es el resultado de la interacción que se produce entre el microorganismo y el medio ambiente en el reactor, y que en rigor es el resultado de los llamaos efectores intra y extra celulares.

Los efectores internos están representados por la dotación genética intrínseca del organismo considerado y por sus mecanismos de regulación metabólica. Estos últimos pueden ser modificados por alteraciones del medio ambiente o más precisamente por los efectores externos mientras que la existencia de un gen depende de la especie del microorganismo considerado. Un gen está o no está, sólo su expresión puede modificarse. Con el fin de mejorarla productividad de un proceso de fermentación las cepas empleadas pueden someterse a tratamiento físico o químico de mutación que al alterar algún sector del genoma logran aumentar la producción de un metabolito aunque también pueden disminuirla o incluso suprimirla.

También se puede dotar a un microorganismo de una capacidad genética nueva cuando se efectúa la inserción de sectores del genoma de una especie en un microorganismo, haciéndose éste capaz de producir metabolitos que desde el punto de vista genético de su especie no podría hacerlo. La obtención de mutantes por el uso de agentes mutagénicos o por algún otro mecanismo bioquímico y la construcción de cepas nuevas por ingeniería genética constituyen los recursos de la genética microbiana, para mejorar la productividad de un microorganismo dado o para dotarlo de una capacidad productiva nueva. Es decir que los efectores internos pueden modificarse para lograr la optimización de un proceso fermentativo. Todos estos aspectos serán considerados especialmente en el capítulo siguiente, que corresponde al mejoramiento de los microorganismos de interés industrial.

El comportamiento o expresión fenotípica, o sea lo que realmente se observa como respuesta del microorganismo al medio ambiente en el reactor es, además, el resultado de la influencia de las variables de naturaleza física y química que constituyen los efectores externos.

Los efectores externos de naturaleza física están vinculados con las condiciones de operación que se utilizan en los reactores y son por ejemplo la temperatura, la agitación, aireación, etc; es decir, están constituidos por las variables de manipulación física que se fijan o se programan en el curso del proceso de producción.

La modificación de algunos de los efectores físicos como por ejemplo la temperatura, tiene un efecto notable sobre un proceso. Si el valor utilizado no es adecuado puede disminuir o aún impedir la formación de un metabolito determinado. Además la temperatura puede modificar los requerimientos nutritivos de algunos microorganismos, lo que significa que al modificarse el valor de un efector puede cambiar los requerimientos de otro.

Los efectores externos de naturaleza química están representados por la presencia de los componentes de los medios de fermentación, además del 0_2 que puede considerarse un nutriente más. Los componentes de los medios deben cumplir con todos los requerimientos nutricionales y además con los requerimientos específicos que son indispensables para la formación de productos. Los aspectos fundamentales de los medios, como su diseño y formulación, serán tratados en el capítulo 4.

Los reactores están también estrechamente vinculados al manejo o manipulación de los efectores externos, ya que además de la regulación de las variables físicas permiten según el modo de operarlos fijar o regular la alimentación de componentes de los medios que, como ya se dijo, constituyen los efectores químicos. Tal es el caso cuando se operan los reactores en "batch" o en forma discontinua, (todos los componentes son colocados desde un comienzo en el medio de producción) o cuando se opera el reactor en "batch alimentado" donde la alimentación de los componentes se realiza en forma controlada durante el proceso. Finalmente cuando se opera el reactor en continuo, se alimenta medio completo a una determinada velocidad al mismo tiempo que se deja salir con la misma velocidad medio fermentado, lo que permite tratar a la velocidad de crecimiento específico como variable independiente. Estos aspectos serán desarrollados especialmente en el capítulo 7.

La influencia de los efectores internos y externos sobre el comportamiento de una célula microbiana se puede representar esquemáticamente como lo muestra la Fig. 1.

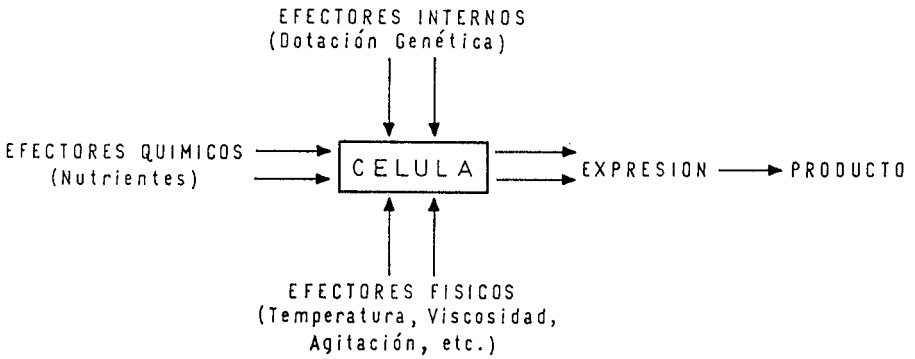


Figura 1. Influencia de los efectores internos y externos sobre la expresión celular.

Para comprender con claridad estos conceptos es conveniente citar algunos ejemplos demostrativos. Supongamos una cepa de un microorganismo (B. subtilis) que genéticamente está en condiciones de efectuar la biosíntesis de una enzima (a-amilasa) y que es colocada en un medio de cultivo adecuado y en condiciones de operación óptimas para la producción de esa enzima. Por medio adecuado se entiende una fuente de carbono como el almidón o dextrina, además de fuente orgánica de nitrógeno, y otras sales minerales. Por condiciones de operación óptimas se consideran la temperatura de 30-37 °C, agitación, pH inicial 6.5-7.0. Supongamos también que el proceso es de tipo "batch". Si en la composición del medio utilizamos glucosa, por ejemplo, difícilmente tendremos un rendimiento normal de a-amilasa mientras exista glucosa en el medio, debido a la influencia negativa de ésta, ya que la misma actúa como represor catabólico de la biosíntesis de la enzima. Este es un ejemplo negativo de un efector externo (glucosa) que no permite la expresión del gen de la cepa. No solamente la glucosa tiene este efecto sino en general cualquier otra fuente de carbono que sea de consumo rápido.

Si en cambio se opera el reactor como "batch" alimentado, con alimentación programada de glucosa, la influencia negativa de ese efector externo desaparece, porque su concentración se mantiene en límites muy bajos.

Otro efector externo de naturaleza química que inhibe la biosíntesis de otros productos como muchos antibióticos es el anión fosfato. Por eso la producción industrial de esos compuestos debe hacerse de manera tal que existan concentraciones limitantes de fosfato inorgánico. Si éste esta en concentraciones de 0.3 a 300 mM generalmente se producen crecimientos celulares altos pero concentraciones superiores a 10 mM suprimen la síntesis de muchos antibióticos.

La presencia de azúcares asimilables superiores a 0.16 g l^{-1} produce invariablemente formación de alcohol en proceso de crecimiento de levadura de panificación (Saccharomyces cerevisiae) aún en presencia de exceso de oxígeno. Es el denominado efecto Crabtree. Es por ello que la producción de levadura se debe llevar a cabo con sistemas de "batch" alimentado con alimentación programada de azúcares para maximizar la formación de biomasa e impedir la formación de alcohol. Es otro ejemplo de la influencia de un efector externo o de naturaleza química sobre la actividad metabólica de un microorganismo.

Para investigar adecuadamente la influencia de los efectores externos químicos, es necesario el empleo de sistemas continuos, aspecto que será tratado en el capítulo 7.

Esquema de un proceso industrial

En la Fig. 2 se presenta un esquema general de un proceso de fermentación. Como puede verse existen 4 etapas bien diferenciadas, a saber: 1) Propagación de cultivos, lo que se realiza en el laboratorio y que comienza generalmente en un tubo de ensayo que contiene un repique reciente del microorganismo o un tubo liofilizado o congelado donde se conserva la cepa de interés o de una colonia del microorganismo previamente seleccionada. Este material microbiológico seleccionado constituye el punto de partida con el cual se debe aumentar la cantidad del mismo mediante sucesivos pasajes en frascos de volúmenes crecientes que son generalmente operados en agitadores de vaivén o rotatorios en cámaras de cultivo. 2) Fermentación: con el material obtenido anteriormente, se siembra el tanque de inoculo que puede tener un volumen de 50, 500 ó 1000 1 según la escala industrial posterior. Del tanque de inoculo se pasa posteriormente al fermentador industrial cuyo volumen, que varía de acuerdo al producto a obtener y a su

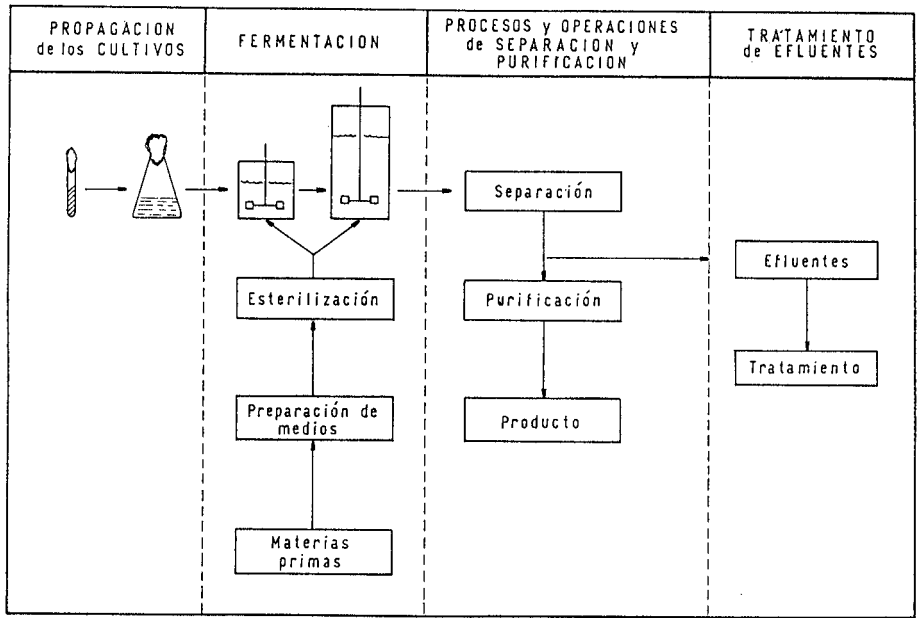


Figura 2. Esquema general de un proceso de fermentación.

concentración, está comprendido comúnmente entre 10,000 y 100,000 l. En algunos casos especiales, como en la producción de proteína unicelular, los tanques de fermentación pueden llegar hasta 1,000,000 l. Un proceso esencial ligado a la producción es la preparación y esterilización de los medios que se lleva a cabo también en esta etapa (previamente a la inoculación) ya sea en el tanque de inóculo o en el reactor industrial. 3) Operaciones y proceso de separación y purificación de los productos; estas etapas comprenden en forma general y sucesivamente: a) separación de insolubles por filtración, centrifugación, o decantación; b) separaciones primarias por extracción, absorción, adsorción, ultrafiltración; c) purificación por extracción líquido-líquido, o extracción a dos fases acuosas, o cromatografía de afinidad, y finalmente d) aislamiento del producto. 4) Tratamiento de efluentes: si bien no tiene una relación directa con el producto, que es la razón de ser de la industria de fermentación, representa una etapa imprescindible porque es fundamental controlar la calidad del efluente que sale de la fábrica y que es enviado generalmente a un curso de agua, sea un canal, arroyo, un río o al mar.

Es importante tener en cuenta que todas las etapas de un proceso de fermentación deben estar íntimamente ligadas e integradas ya que es indispensable que el proceso sea optimizado globalmente. Cada etapa debe considerar la importancia e influencia de los procesos y operaciones anteriores y también de los siguientes para poder cumplir con ese concepto de integración. La calidad de una cepa de microorganismo debe estar supeditada a su real capacidad de producción en el fermentador. Pero además es necesario que esa cepa, altamente productora, no produzca, por ejemplo, dificultades en la etapa de separación y purificación como es el caso de cepas de *Penicillium chrysogenum* que no pueden utilizarse porque producen pigmentos que encarecen las etapas de purificación. Lo mismo sucede con el uso de medios, basados en subproductos como el suero de queso, que pue-

den dar buenos rendimientos de un producto pero que representan un inconveniente en la etapa de purificación.

Además, el reactor y las condicioines de operación deben ser tales que aseguren la productividad máxima del proceso y la calidad del producto, que en algunos casos depende de las condiciones de operación empleadas como sucede con algunos preparados enzimáticos cuya composición es regulada según como se opere en la etapa de la fermentación y en la correspondiente a la separación y purificación.

Lecturas recomendadas:

1. A. Fiechter - *Physical and chemical Parameters of Microbial Growth. Advances in Biochemical Engineering Vol.* 30, 7-60. Springer-Verlag, 1984.

Capítulo 3

SELECCION, MANTENIMIENTO Y MEJORAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE INTERES INDUSTRIAL

Selección

Debido a que el éxito o fracaso de un proceso fermentativo comienza con el microorganismo utilizado, en la elección del mismo se deberían tener en cuenta ciertos criterios generales que se indican a continuación:

1. La cepa a utilizar debe ser genéticamente estable.
2. Su velocidad de crecimiento debería ser alta.
3. La cepa debe estar libre de contaminantes, incluídos fagos.
4. Sus requerimientos nutricionales deberían ser satisfechos a partir de medios de cultivo de costo reducido.
5. Debe ser de fácil conservación por largos períodos de tiempo, sin pérdida de sus características particulares.
6. Debería llevar a cabo el proceso fermentativo completo en un tiempo corto.
7. Si el objetivo del proceso es un producto, éste debería ser de alto rendimiento y de fácil extracción del medio de cultivo.

Los microorganismos que se utilizan en un proceso, pueden ser obtenidos por aislamiento a partir de fuentes naturales o de una colección de cultivos. A nivel industrial, en general, cada firma posee su propia colección de organismos, muchos de los cuales han sido mejorados a través de técnicas clásicas de mutación o de ingeniería genética. Sin embargo, estas cepas sólo son empleadas por la industria que las posee, debido al gran valor comercial de las mismas. En algunos casos se dispone de organismos modificados genéticamente para llevar a cabo reacciones específicas de biosíntesis, degradación o biocatálisis, los cuales están protegidos por patentes. Esto significa que un gran porcentaje de organismos aislados o modificados no son disponibles para uso general en laboratorios.

Existen en el mundo un gran número de colecciones depositarias de cultivos. Entre la diversidad de colecciones se destacan: "American Type Culture Collection", USA, la cual mantiene bacterias, levaduras, algas, actinomycetes, mohos, protozoos, virus y líneas celulares; "Colletion Nationale de Cultures de Microorganismes" del Institut Pasteur, Francia; "Northern Regional Research Laboratory" (NRRL), de Peoria, USA, y "National Collection of Type Cultures", Londres, Inglaterra.

Si el organismo a utilizar es aislado de fuentes naturales como agua, suelo, plantas y desechos, la elección del material de partida puede hacerse teniendo en cuenta que el organismo exprese en ese ambiente las propiedades que son de interés. Por ejemplo, en suelos tratados con pesticidas se podrían encontrar organismos adaptados a la degradación de estos productos químicos; o en larvas de insectos muertos agentes causales de la muerte.

Elegida la fuente de aislamiento, las posibilidades de éxito dependen de la técnica elegida para el mismo; en este caso las alternativas son: a) aislamiento directo, o b) enriquecimiento del cultivo con o sin pretratamiento de la muestra.

Una vez efectuado el muestreo y selección (screening) para el aislamiento de una cepa de interés, la misma deberá ser caracterizada. En este procedimiento se debe tener en cuenta que la composición química del material a partir del cual se va a realizar el aislamiento comienza a variar a partir del momento en que es tomada la muestra, por lo tanto ésta se debe procesar rápidamente, tratando de evitar alteraciones que afecten a la población de interés.

a) *Aislamiento directo:* en este caso es deseable que el medio que se utiliza para el aislamiento permita la máxima expresión del material genético del organismo. Si se busca por ejemplo un organismo con acción antimicrobiana, se puede crecer al potencial productor, en una caja de petri en presencia del o los organismos contra los cuales se requiere la acción antimicrobiana, observándose la producción del inhibidor por las zonas de inhibición de crecimiento.

Para la detección de productores de factores de crecimiento tales como aminoácidos y necleótidos se utiliza la estimulación del desarrollo de bacterias auxótrofas por un lisado del organismo. Esto se puede llevar a cabo en medios sólidos. En este caso se debe tener una "réplica" de la caja a ensayar. Una vez obtenido el crecimiento en la primer caja, se replica a una segunda, antes de "matar" las colonias con luz. U.V., por ejemplo. Esta caja es luego cargada con agar conteniendo una suspensión del organismo auxótrofo al producto buscado. Después de un período de incubación se observa crecimiento en forma de halo alrededor de las colonias productoras, lo que permite el aislamiento de este organismo de la placa réplica.

b) *Enriquecimiento del cultivo:* esta técnica consiste en incrementar en una población mixta el número de organismos de interés en relación al resto. De esta forma se busca favorecer el crecimiento de un tipo dado de microorganismos me diante condiciones de cultivo adecuadas al mismo, o de condiciones inapropiadas para el desarrollo de los otros. Esto se logra mediante el empleo de sustratos espe-cíficos o ciertos inhibidores. Para mantener la fuerza selectiva del medio, el cual se modifica por el crecimiento del organismo buscado, se realizan subcultivos periódicos en medio fresco. Esto lleva a que el organismo de interés sea el dominante de la población, lo cual facilita su posterior aislamiento en medio sólido. Se debe considerar en este caso el efecto del medio sobre la velocidad específica de crecimiento (u).

La selección de un organismo por este procedimiento depende de su valor de u comparado con los de los otros organismos. Evidentemente el dominante de la población será el que posea el mayor valor de u para las condiciones de cultivo empleadas. Sin embargo no necesariamente sera mas útil un organismo de u más alto; puede ser deseable uno con mayor afinidad por el sustrato. El problema de selección puede ser superado empleando el sistema de cultivo continuo, tema que se trata en el capítulo 7, donde la fuerza de selección se mantiene a un nivel constante y el organismo dominante será seleccionado por su afinidad por el sustrato, más que por su u máxima

En la Fig. 3 se muestra un modelo de competición entre dos organismos capaces de crecer en un cultivo continuo enriquecido.

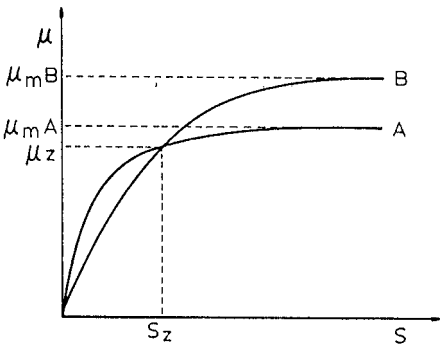


Figura 3. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad específica de crecimiento de dos organismos A y B.

En cultivo continuo el valor de um está determinado por la concentración de sustrato y es igual en estado estacionario a la velocidad de dilución (D). A valores de u = D < uz se tiene que uA > uB y por lo tanto el organismo A podrá ser seleccionado a pesar de que umA < umB (uz = valor de u a partir del cual uB > uA).

Mantenimiento o conservación de los cultivos

Los objetivos de la conservación de los cultivos se podrían resumir en los siguientes aspectos: a) preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas; b) preservar los niveles de su productividad inicial; c) lograr que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad. Esto último puede ser un factor esencial en la selección de un método de preservación.

En todo trabajo de Microbiología se deben conocer las características de la población con la cual se va a trabajar (propiedades morfológicas y bioquímicas). En este sentido, tanto en la conservación como en el desarrollo del cultivo, ya sea el que suministra o el que recibe la cepa, deberían usar las mismas técnicas metodológicas. Tanto para el mantenimiento, preparación y propagación de inóculos se deben usar métodos reproducibles que no produzcan variaciones o pérdidas de las características de la cepa empleada.

No hay métodos de mantenimiento en procesos industriales que sean comunes a todas las industrias, empleándose en algunos casos métodos específicos secretos.

El conocimiento de las características del cultivo es esencial en la elección de un método de preservación. La identidad del cultivo puede conocerse en base a sus características de crecimiento en uno o más medios específicos, tomando en consideración propiedades macro y microscópicas exhibidas, o en base a una evaluación más exhaustiva empleando muchos ensayos bioquímicos, biológicos, inmunológicos y genéticos.

En general los cultivos no son estudiados en detalle debido a la casi imposibilidad de determinar en cada etapa si ha habido o no alteración genética. En la. mayoría de las situaciones solamente se pueden notar cambios mensurables u observables tales como pigmentación, morfología, reacciones fermentativas, propiedades microscópicas, etc. El análisis de estos parámetros junto con la determinación cuantitativa del recuento de colonias antes y después del proceso de mantenimiento brindan la información necesaria para la correcta evaluación de la técnica de conservación a elegir.

Los métodos de preservación o mantenimiento más importantes son los siguientes:

Subcultivos

Es un método común de conservación, que consiste en el repique periódico del cultivo en un medio nutritivo fresco. El intervalo de transferencia varía con el microorganismo, debiendo considerarse el medio adecuado para cada especie. Una vez desarrollados los cultivos se mantienen a 4 °C durante lapsos que oscilan entre 15 días y 2 meses. Los inconvenientes que presenta son varios: a) incremento de la posibilidad de mutación con cada transferencia, con pérdida de las características del organismo; b) riesgo de contaminación; c) alteraciones en el medio de cultivo, durante la estadía en frío, en la cual se produce una desecación gradual del mismo.

Mantenimiento bajo capa de aceite

Es una técnica simple y efectiva para prolongar la conservación de muchos organismos y consiste en cubrir completamente el cultivo después de su desarrrollo en medio sólido, con una capa de aceite mineral o vaselina estéril. Los cultivos en esta forma se pueden conservar a temperatura ambiente o aún mejor en heladera por períodos de varios años. Algunos autores sostienen que en estas condiciones los microorganismos pueden continuar reproduciéndose, con posibilidades de aparición de mutantes; sin embargo se acepta que estas alteraciones no se observan hasta los tres años de mantenimiento.

Congelación

Debido a que la actividad metabólica de una célula se reduce considerablemente por mantenimiento a muy baja temperatura, la congelación es una técnica de elección, ya sea para cortos o largos períodos de tiempo. A esto ha contribuido también la mayor disponibilidad de nitrógeno líquido (-196 °C) y el mejoramiento de los equipos de refrigeración. La técnica involucra el crecimiento del cultivo hasta la fase estacionaria, ya que en general en esta etapa las células son más resistentes a los daños por congelación y descongelación, que las de fase exponencial. También es aconsejable utilizar una densidad celular elevada en la congelación, debido a que, cuando parte de las células se lisan se liberarían sustancias crioprotectoras que aumentarían el porcentaje de células sobrevivientes.

Las células a congelar pueden ser resuspendidas directamente en un agente crioprotector o se puede agregar el mismo como aditivo al medio de cultivo. El más empleado es glicerol al 10%, aunque otros agentes como dimetilsulfóxido, glucosa, dextranos, sacarosa, suero de conejo, lactosa y extrato de malta, han sido también empleados.

La suspensión celular es colocada en ampollas (vidrio o plástico) y sellada antes de colocarla bajo nitrógeno líquido. Uno de los problemas de esta técnica se refiere a la velocidad de congelación.

Muchos estudios son coincidentes en señalar que una velocidad de congelación lenta y una rápida descongelación rinden los mayores números de células viables. Se encontró que dependiendo de la naturaleza de las células, existe una velocidad de congelación óptima en cada caso para obtener una máxima sobrevida. Como criterio general se puede decir que, lo más ampliamente usado es el enfriamiento a 1 °C min^{-1} (ya que una rápida congelación causa ruptura de membranas) hasta -20 °C y luego un rápido descenso.

En cuanto a la temperatura de conservación, la más baja recomendada es -70 °C, ya que a temperaturas más altas ocurren algunas recristalizaciones, las cuales si son intracelulares son letales para las células.

En caso de nitrógeno líquido, la conservación podría prolongarse por años, asegurando una buena provisión del mismo y disponiendo de equipos con sistemas de alarma en caso de fluctuaciones de temperatura.

Cultivos en tierra

La tierra estéril puede ser inoculada con un cultivo e incubada varios días para inducir esporulación de bacilos aerobios y anaerobios. Una vez que la misma se manifiesta, la tierra es secada (desecador) y el cultivo mantenido de esta forma en una atmósfera seca o en refrigerador. El método ha sido utilizado ampliamente con hongos y actinomycetes, los cuales han sido mantenidos en estas

condiciones varios años. También se puede utilizar tierra para la conservación directa de suspensiones de esporos.

Preservación en celulosa

El empleo de un soporte de papel para el mantenimiento de células en condiciones de ausencia de agua es un procedimiento adecuado y sencillo, para conservar cepas. La técnica consiste en embeber tiras de papel de filtro con una suspensión densa de organismos en suero, glutamato de sodio u otro agente, las mismas son posteriormente colocadas en tubos para su posterior secado bajo vacío. De esta forma se han logrado conservar cepas de Streptomyres y Salmonella por períodos de hasta 2 años a temperatura ambiente.

Liofilización

La liofilización está considerada como el método más adecuado para la preservación de microorganismos. La técnica involucra el congelamiento de un cultivo seguido por un secado bajo vacío, lo cual resulta en la sublimación de agua de la suspensión celular. La ventaja es que la mayoría de los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

La liofilización es apropiada para la conservación de la mayoría de las bacterias, encontrándose que las Gram-positivas sobreviven mejor que las Gram-negativas cuando se las liofiliza y mantiene en condiciones similares. También se emplea en la conservación de esporos, actinomycetes y muchos hongos incluidas levaduras. Sin embargo, no es adecuada para células animales, algas y hongos en fase de micelio.

La técnica consiste en partir de un cultivo de fase estacionaria (donde las células son usualmente más resistentes) resuspendiendo las células con un medio crioprotector, en el cual se obtenga una alta densidad celular. Unas pocas gotas de suspensión celular son transferidas a una ampolla, la cual es congelada a aproximadamente -40 °C y deshidratada mediante una sublimación en vacío. Este debe ser mantenido en 5-10 um mediante una bomba. El secado continúa hasta llegar a valores de humedad del orden del 1%; luego, la ampolla es sellada bajo vacío. Se debe evitar la formación de radicales libres que se producen por exposición de las células al oxígeno, ya que están asociados con pérdida de viabilidad; de allí la importancia de mantener el vacío.

El medio empleado en la liofilización es un factor importante en el proceso. Entre los agentes recomendados están la leche descremada en concentraciones del 10 al 20%; suero equino, mezclas de suero, glucosa y extrato de levadura; suero fetal bovino, etc. En algunos casos el efecto protector de la leche descremada es mejorado por el agregado de solutos tales como ácido ascórbico o tiourea.

La sacarosa se ha empleado para reemplazar la leche descremada, y para mejorar su performance se le adiciona glutamato de sodio y bacto casitone u otro componente nitrogenado.

Normalmente la liofilización produce daños en las células, siendo los mismos en algunas casos reversibles, por lo cual éstas necesitan un tiempo de recuperación que es variable en función del tipo de daño producido.

En la reconstitución de un tubo liofilizado se logra incrementar la sobrevida de los microorganismos si en lugar de agua destilada se agrega caldo nutritivo o el mismo medio que se usó para el crecimiento inicial de las células; de esta forma al mantenerse elevada la presión osmótica durante la rehidratación se logra que la misma proceda en forma lenta.

Se encuentra con frecuencia que el crecimiento después de la rehidratación tiene una fase de retardo extendida. Se puede reducir esta fase si se emplea para el crecimiento un medio de igual composición que el que da óptimo desarrollo pero disminuyendo su concentración original entre un 25 y un 50%.

En general no es posible determinar para cada grupo de organismos el método de conservación ideal, por lo que se trata de emplear el más adecuado. De todos, la liofilización es el más utilizado, aunque algunos organismos muestran altas tasas de mortandad. En este caso la alternativa es la congelación, a pesar de que las cepas mantenidas de esta forma son difíciles de transportar.

Mejoramiento de microorganismos industriales

En general los organismos aislados de la naturaleza productores de metabolitos de interés industrial producen a los mismos en niveles muy bajos, por lo tanto se hace necesario incrementar estos rendimientos para lograr una mayor rentabilidad de los procesos.

Una forma de mejorar el rendimiento es mediante la optimización del medio de cultivo y de las condiciones de operación, pero esto está limitado por la capacidad de síntesis máxima del producto deseado que tiene el organismo. La otra posibilidad es el mejoramiento genético de la cepa.

Como ya se dijo, la productividad potencial de un organismo es controlada por su genoma, pudiendo el mismo ser modificado para incrementar los rendimientos. Con el organismo modificado, se reexaminan las condiciones del cultivo para lograr nuevamente la máxima productividad. Por lo tanto los programas de desarrollo involucran una continua modificación genética del microorganismo, seguida por una readaptación del medio de cultivo a los nuevos requerimientos, mejoras de las condiciones de operación y también de los procesos de extracción y purificación.

La obtención de cepas modificadas genéticamente se puede realizar por 1) Selección natural de variantes, 2) Mutación inducida, y 3) Recombinación genética.

1. Selección natural

Se debe tener en cuenta que en cada división celular hay una pequeña probabilidad de que ocurra un cambio genético, por lo cual no es sorprendente que en una gran masa celular la población sea heterogénea. Esta distribución puede presentar problemas de rendimientos debido a que en general las variantes tienen menores niveles de producción que la población parental. Estos cambios definitivos (mutaciones) se deben distinguir de las variaciones fenotípicas que dependen de las condiciones ambientales y que tienen lugar en todas las células de la población que expresan la misma modificación fisiológica, dentro de las variaciones permitidas por su genotipo. En las mutaciones espontáneas el elemento responsable de la mutación no es conocido, pero igual que las inducidas (el factor mutagénico se conoce) son estables y hereditarias y tienen una frecuencia estadísticamente medible (tasa de mutación).

La frecuencia de mutaciones espontáneas varía entre 10^{-6} a 10^{-9} mutaciones por genoma y por generación. Por lo tanto si se considera un valor de 10^{-7} se deberán estudiar un gran número de organismos ($> 10^{7}$) en la búsqueda del tipo deseado.

En la selección de variantes naturales, una práctica que todavía es utilizada se refiere a la observación de las características morfológicas de las colonias, las cuales, en manos de un operador avezado, se asocian con mayor o menor productividad, lo que permite seleccionar y posteriormente estudiar los clones aislados.

Estos estudios involucran una etapa de crecimiento seguida por ensayos de evaluación del producto. En estos casos es más adecuado realizar las experiencias en erlenmeyers de hasta 500 ml, ya que si bien demanda una considerable mano de obra, los resultados de ensayos en tubos o pequeños frascos son menos confiables.

A veces es posible el diseño de un procedimiento simple de "screening" selectivo para un tipo particular de mutantes. Por ejemplo, células no mutadas que mueren en un plaqueo por selección de mutantes resistentes a drogas, metales, etc. En estas condiciones se aíslan mutantes con un esfuerzo mínimo aún de poblaciones donde la tasa de mutación es menor a 1×10^{-6}.

Cuando se comparan los incrementos en los rendimientos de cepas obtenidas por mutaciones naturales como las que resultan del empleo de un agente tal como la luz ultravioleta se observa, en general, que con agentes como el mencionado los incrementos en productividad son superiores y con una mayor tasa de mutación.

2. Mutación inducida.

El procedimiento de mutación mediante el empleo de un agente determinado implica dos etapas, el tratamiento de la población con el mutágeno elegido y luego el aislamiento de los mutantes para su posterior ensayo y selección.

Empíricamente el empleo de diferentes agentes resulta en el aislamiento de distintos "espectros" de mutantes.

La elección de un agente mutagénico depende en general de consideraciones prácticas. En algunos de los casos es más conveniente el empleo de más de uno en lugar del uso masivo de uno solo. La técnica a emplear puede producir una alta tasa de mutación o puede favorecer la separación de un número reducido de tipos deseables de un gran número de productores mediocres.

Hasta donde sea posible el aislamiento del mutante debería utilizar la característica mejorada del mismo como factor de selección. El incremento de su productividad podría ser el resultado de una modificación en los mecanismos de control que limitan el nivel de producción y/o de una variación en los precursores que llevan al producto. En este sentido el conocimiento de las rutas y mecanismos de control de la biosíntesis de un producto facilitan la estrategia a seguir en el aislamiento.

Es importante en los programas de búsqueda y selección, tener una alta proporción de mutantes entre la población sobreviviente al tratamiento, debido a que sólo estos individuos son los estudiados. Con el aumento de la dosis del mutágeno en general se incrementa esta proporción, aunque para cada mutágeno y cada organismo hay una dosis óptima.

Los agentes mutagónicos pueden ser agrupados en:

1) Físicos, como la luz ultravioleta, que es un mutágeno muy conveniente. La longitud de onda puede variar de 200 a 300 nm y el tiempo de exposición entre 0.5 y 20 minutos, dependiendo de la sensibilidad del organismo y tratando de lograr un porcentaje de muerte entre el 90 y 99.9%. Otros agentes como rayos X y rayos γ son actualmente poco utilizados.

2) Químicos: Estos agentes se emplean en concentraciones del orden de 0.05 M con exposiciones de 0.5 a 12 horas. Como muchos de ellos son no tóxicos, el grado de mortandad no es empleado como dato de eficiencia. El tratamiento se realiza adicionando el mutágeno a una suspensión de células, la cual es incubada a temperatura constante un determinado tiempo. Estas manipulaciones requie-

ren personal con experiencia debido a las lesiones que pueden ocasionar. Entre estos agentes se destacan los siguientes: a) Acido nitroso. Este agente induce transiciones A-T --- G-C y/o deleciones por uniones cruzadas en el interior de la cadena. b) N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG). Es uno de los mutágenos más potentes, produciendo una alta tasa de mutación con bajo porcentaje de mortandad. Requiere de un manejo sumamente cuidadoso. c) Análogos de base. Producen transiciones, como el 5-bromuracilo y la 2-aminopurina, siendo otros análogos menos efectivos. Sus modos de acción dependen de sus incorporaciones al nuevo ADN formado y del lugar que ocupen al sustituir a la base normal. d) Mutágenos estructurales, como la proflavina o naranja acridina que no son incorporados covalentemente al ADN, sino que actuan como agentes de intercalado en la estructura, promoviendo adiciones o deleciones simples durante la síntesis.

Mutantes con niveles mejorados de metabolitos primarios

Metabolitos primarios son aquellos esenciales para la vida de un microorganismo como por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, ácidos orgánicos.

Antes de considerar la selección de este tipo de mutantes, es necesario conocer los mecanismos de control involucrados en la biosíntesis de estos metabolitos. Las concentraciones de los mismos están reguladas por sistemas de control por retroalimentación ("feed back). Los dos principales sistemas involucrados son inhibición y represión "feed back".

En la inhibición, el producto final de una vía metabólica inhibe la actividad de una enzima (normalmente la primera) de su vía de formación, cuándo se ha sobrepasado un valor máximo de concentración intracelular de dicho producto (caso de biosíntesis de aminoácidos). La primera enzima de la vía es de tipo "alostérica", lo que significa que en este caso el producto final se une a ella en el centro regulador (no compite con el sustrato por el centro activo, como en la llamada inhibición competitiva), afectando la unión de la enzima al sustrato. Es un control fino y casi instantáneo.

La represión es aquella donde el producto final de una vía metabólica previene la síntesis de una enzima o de todas las que catalizan la vía mencionada. Esto ocurre a nivel de ácido desoxirribonucleico (ADN), impidiendo la transcripción del gen a ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Este mecanismo es de acción más lenta que el anterior, ya que permite actuar a las enzimas preformadas.

Los mecanismos de regulación son más complejos en caso de vías biosintéticas ramificadas donde los productos de cada brazo son raramente requeridos por el organismo en igual proporción. Los procesos de control de estos son los siguientes: a) por isoenzimas; b) concertado o multivalente; c) cooperativo; d) acumulativo; e) secuencial. Para un conocimiento detallado de estos mecanismos de control se remite al lector a la bibliografía.

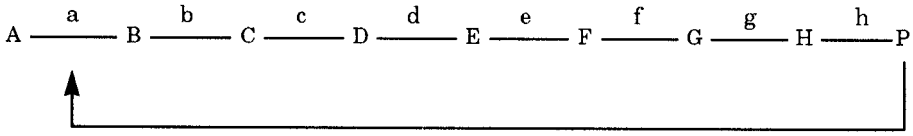
Como se ve, la concentración de un metabolito microbiano es controlada por una variedad de mecanismos. El conocimiento de la vía metabólica y su control facilita la construcción del mutante deseado. Estos pueden tener distintas modificaciones: a) el mutante no reconoce la presencia del inhibidor o represor; b) no se produce producto final, que es el que controla la enzima clave de la vía metabólica; c) el producto final es eliminado de la célula debido a una modificación en la permeabilidad de la membrana celular.

Los mutantes que no producen inhibidores o represores por producto final pueden ser empleados para la producción de intermediarios en caminos no ramificados, o de intermediarios y productos finales en caminos ramificados.

Al no producirse el producto final de la ruta, el control de la misma es eliminado, pero como estos productos son esenciales para el crecimiento, los mismos se deben incorporar al medio en concentraciones tales que permitan el desarrollo, pero que no ejerzan el control normal por inhibición o represión. En este caso los mutantes son auxotróficos para uno o más productos finales. El aislamiento dé estos mutantes puede resultar en la obtención de un cepa altamente productora, si la mutación ocurre en el sitio correcto.

La selección de auxótrofos se puede realizar empleando técnicas de enriquecimiento o mediante la identificación visual de mutantes. Por ejemplo, la separación mecánica de esporos auxótrofos y prototróficos de organismos filamentosos ha sido alcanzada por el método de "enriquecimiento por filtración". Se ha aplicado a *Aspergillus, Neurospora,* etc.. El procedimiento implica la incubación de una suspensión de esporos mutada, en un medio líquido mínimo; los protótrofos desarrollan en tanto que los auxótrofos no. La suspensión es luego filtrada a través de un filtro adecuado, obteniéndose un filtrado enriquecido en auxótrofos, debido a que los esporos germinados por su mayor tamaño son retenidos en el filtro.

Si bien los mutantes auxotróficos se utilizan para producir grandes cantidades de muchas sustancias de interés, los mismos no son adecuados para la obtención de productos que controlan independientemente su síntesis. Un caso típico es el que figura a continuación, donde se sintetiza un producto P.



Las letras minúsculas indican las enzimas que intervienen en el proceso.

En este caso si P es el producto requerido, no es apropiado tener un auxótrofo.

La solución es modificar el organismo de tal forma que la primer enzima (a) no reconozca la presencia de niveles inhibidores de P. El aislamiento de tales mutantes se puede alcanzar a partir de mutantes resistentes a metabolitos análogos y/o de revertantes.

Los metabolitos análogos (compuestos similares a otros en su estructura) han ampliado el rango de inhibidores para los cuales se obtienen mutantes resistentes.

En el ejemplo de la vía metabólica anteriormente presentado si P* es un análogo tóxico de P, un mutante puede ser aislado en presencia de P* si por ejemplo, la primera enzima de la vía no es suceptible a la inhibición por el análogo. Esta enzima también podría ser resistente al efecto de control de P, por lo cual habría una producción no inhibida. Para el aislamiento de este tipo de mutantes se puede emplear la técnica de gradiente en placa, en la cual existe una variación en la concentración del análogo en un sentido de la placa, presentando la misma, zonas de escaso crecimiento por altos niveles del análogo tóxico desde donde es posible aislar los mutantes resistentes. Estos deberán ser posteriormente estudiados en relación a la producción de P.

Otra posibilidad de mejorar los rendimientos de este tipo de productos es el empleo de revertantes. En este caso un mutante auxotrófico para P (no produce la enzima "a") es sometido a una segunda mutación con el objeto de obtener revertantes que elaboran el producto final en mayores niveles (la enzima "a" producida no reconoce en control de P).

Mutantes resistentes a análogos de aminoácidos han sido empleados en procesos de mejoramiento de cepas, para la obtención de antibióticos.

El mejor ejemplo de mutantes modificados en la permeabilidad es el caso de la fermentación de ácido glutámico. Se ha aislado un mutante de *Corynebacterium glutamicum*, cuya permeabilidad puede ser modificada por el nivel de biotina. O sea la permeabilidad celular es controlada por la composición del medio de cultivo; de esta forma el organismo puede excretar glutamato (50 g l^{-1}) con bajas concentraciones de biotina (5 ug l^{-1}). Esto sugiere la posibilidad de modificar genéticamente la permeabilidad celular para incrementar la productividad.

Mutantes productores de enzimas de interés industrial

Solamente se tendrán en cuenta las enzimas degradativas, cuya producción puede ser controlada por inducción, represión "feed back" y/o represión catabólica. Las técnicas de mutación en este caso pretenden alterar los mecanismos de control para obtener mutantes que puedan producir enzimas en ausencia de inductor y aún en presencia de represores. Las mutaciones pueden tener lugar en un gen regulador, eliminando la producción de un represor activo, o si se producen en el operador, se podría evitar la unión del represor. Los mutantes que producen enzimas inducibles en ausencia de inductor se denominan mutantes constitutivos. Los mismos pueden ser aislados a partir de un cultivo continuo en el cual el sustrato inductor esté en concentraciones limitantes, lo cual favorece el desarrollo de los mutantes constitutivos sobre la población inducible; empleando inductores débiles o utilizando ciclos con y sin inductor, tratando de favorecer el enriquecimiento en la población del mutante constitutivo, ya que al transferir a un medio con inductor el tipo inducible requiere un tiempo de inducción que no lo requiere el constitutivo.

Para la selección de mutantes resistentes a la represión catabólica pueden aprovecharse las posibilidades del sistema continuo empleando un medio de cultivo con el sustrato de la enzima y el represor catabólico. En estas condiciones el organismo capaz de emplear ambos sustratos tendría una ventaja competitiva y podría ser seleccionado a una determinada velocidad de dilución.

Mutantes con mejores rendimientos de metabolitos secundarios

Metabolitos secundarios son sustancias no imprescindibles para las funciones vitales como por ejemplo alcaloides, toxinas, antibióticos, giberelinas, etc.

La relación entre metabolito primario y secundario presenta todavía numerosos interrogantes con relación a los mecanismos que controlan la síntesis de estos últimos. Se deben hacer algunas consideraciones, ya que en ciertas fermentaciones de antibióticos la velocidad de crecimiento regula la formación de enzimas biosintéticas. En el caso de la gramicidina S (GS), las GS sintetasas se forman en la última parte de la fase de crecimiento exponencial. Las enzimas después de alcanzar un pico en sus actividades específicas desaparecen rápidamente al entrar la población en fase estacionaria. Los estudios de este producto en cultivo continuo permitieron establecer una relación inversa entre la velocidad específica de crecimiento y la producción de sintetasa. Si bien el mecanismo no es conocido, se estableció que los picos de actividad específica en función de u varían de acuerdo a la naturaleza del sustrato limitante de crecimiento (C, N, S y P).

Otro factor del proceso de control es la regulación "feed back" lo que significa que la acumulación de metabolitos secundarios (penicilina, cloranfenicol, cicloheximida, cte.) es lo que limita su propia síntesis. En el caso de caminos ramifica-

dos como el de penicilina, la acumulación intracelular de lisina disminuye su producción, efecto que se revierte por el agregado de a-aminoadipato.

Algunos tipos de regulación "feed back" involucran a fosfato inorgánico, el cual regula la actividad de fosfatasas. En algunos casos la adición del fosfato al medio de cultivo limitado se asocia con un incremento de ATP con disminución de la formación de antibiótico.

Como ya se dijo, la glucosa y la fuente de nitrógeno (en especial amonio) si es rápidamente metabolizada ejerce represión catabólica. Un ejemplo es la producción de cafalosporinas por *Streptomyces clavuligerus*, la cual es suprimida por amonio.

Debido a que la producción de estos metabolitos es afectada por mecanismos de control genéticamente determinados, las mutaciones pueden tener efectos importantes en el mejoramiento de cepas. Los programas iniciales en la industria de antibióticos inducían mutaciones sobre células o esporos mediante el empleo de agentes físicos y químicos. Si uno repasa el caso típico de la penicilina en el cual las primeras cepas de Penicill um chrysogenum producían alrededor de 20 unidades ml^{-1},(20 U ml^{-1}), se observa que las técnicas de mutación clásica han permitido obtener mutantes adecuados para la aplicación posterior de técnicas más recientes como la fusión de protoplastos y las de clonaje de genes.

Se pueden emplear dos técnicas de selección al azar, de mutantes obtenidos después de un tratamiento como se indica en la Fig. 4.

Los procedimientos en medios líquidos son en general largos y requieren gran cantidad de material. La ventaja es que el proceso es controlado en condiciones relativamente comparables a las de producción en relación a agitación y aeración.

El test en placas es más rápido, permite controlar un mayor número de colonias con menor material pero en condiciones que no reproducen la fermentación en medio líquido. Se trata aquí de evaluar la cantidad de antibiótico excretado por una colonia. Una variante consiste en cubrir la placa con un celofán estéril y agregar sobre el mismo una capa de agar conteniendo el organismo

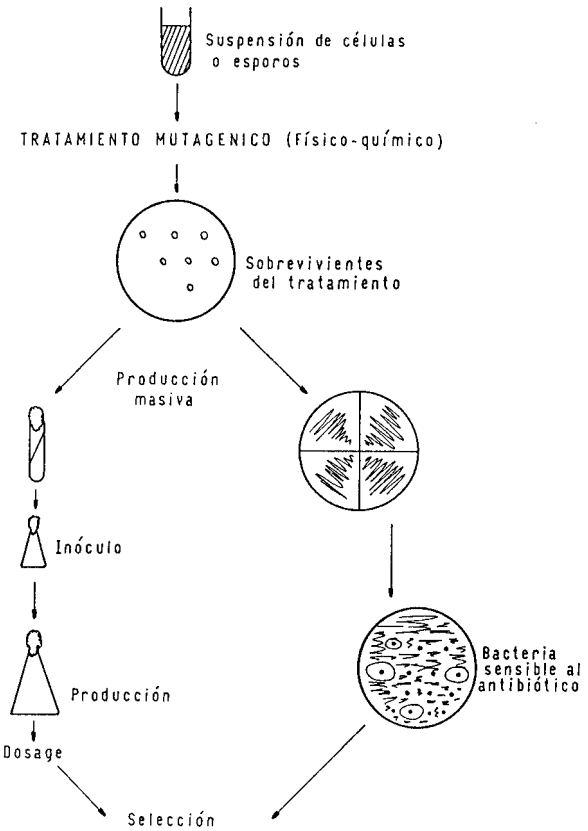


Figura 4. Esquema de mejoramiento por mutación y selección de cepas productoras de metabolitos de interés industrial.

indicador, incubando luego la placa toda la noche. De esta forma, las colonias de los mutantes son mantenidas libres de contaminación por el organismo sensible. En este caso el tamaño de la zona de inhibición es controlado por el espesor de la capa. Evidentemente, como se mencionó anteriormente, el programa de mejoramiento debe incluir una mejora en el medio de producción.

Se observa, en general, en un programa de mejoramiento, que los saltos en la producción al inicio del programa son importantes, pero después la selección de mutantes superproductores se vuelve cada vez más difícil.

Con referencia a los estudios de "screening" en placas, un factor importante es la composición del medio sólido para lograr que la cepa pueda expresar toda su capacidad productora. En algunos casos las condiciones de limitaciones de nu trientes, que favorecen el comienzo de la producción de antibióticos en medio líquido no son alcanzadas en medio sólido, sin embargo esto se puede corregir suprimiendo la principal fuente de carbono y reduciendo, por ejemplo, el contenido de agua de macerado de maíz, como en el caso de penicilina.

Es posible en base a la experiencia adquirida en el curso de los trabajos de mutagénesis-selección, establecer una correlación entre los caracteres fisiológico o bioquímicos y la producción del microorganismo. En este sentido pueden a ve ces intervenir en la selección en medios sólidos criterios morfológicos, pigmentación de colonias, resistencia al antibiótico producido, etc.

3. Recombinación genética

El mejoramiento de una cepa industrial empleando técnicas de mutagénesis-selección conduce a la creación de lineas divergentes. Una estrategia más lógica en tal programa de mejoramiento sería reagrupar las potencialidades de distin tas variantes con el objeto de seleccionar la mejor combinación de genes responsables de codificar la producción de determinado metabolito.

A partir de 1977 con los trabajos de Hopwood se muestra que es posible lograr la recombinación genética, definiendo por tal a cualquier proceso que genere nuevas combinaciones de genes los cuales estaban originalmente en individuos diferentes.

Todos los procesos no meióticos en células vegetativas que llevan a recombinación son llamados parasexuales y aparecen tanto en organismos procariotes como eucariotes.

Los virus pueden intercambiar material genético entre cepas heterogénicas después de una infección mixta en el mismo huésped. En bacterias el fenómeno de recombinación se observa en: 1) conjugación, en donde la transferencia de material genético se realiza a través de pilis, teniendo algunas características de un proceso sexual; 2) transducción, en el que la transferencia de ADN de una célula a otra se realiza mediante una partícula viral que actúa como vector; y 3) transformación, donde la recombinación puede ocurrir después de la inserción experimental de un ADN aislado, a una bacteria receptora.

El intercambio de material genético entre diferentes especies puede también ser alcanzado por fusión celular. El primer paso en este caso es la preparación de protoplastos, los cuales son células que han perdido su pared celular externa y son limitadas solamente por su membrana. Se los prepara sometiendo una suspensión celular a la acción de enzimas degradativas de la pared (lisozima) en un medio isotónico, para minimizar la ruptura por efectos osmóticos. Los protoplastos de los cultivos que se desea fusionar, son mezclados y fusionados en presencia

de un agente inductor (polietilenglicol 50%) y de dimetil sulfóxido en algunos casos, luego de lo cual se los siembra rápidamente en un medio completo para regenerar las células. La incubación de protoplastos resulta en regeneración de la pared celular y reversión a una célula de morfología normal, lo cual es una propiedad crítica, ya que después de la fusión se desea recuperar un organismo, el cual pueda ser cultivado normalmente en pequeña y gran escala. La fusión celular es seguida por fusión nuclear. La técnica de fusión celular se emplea en la obtención de hibridomas que son células que se obtienen por fusión de linfocitos con células de mieloma (cáncer de piel) de ratón u otro animal. Cada célula de hibridoma sintetiza una sola especie molecular de anticuerpo. El cultivo de este tipo de células produce anticuerpos monoclonales, los cuales tienen una enorme importancia en reactivos de diagnóstico, en la purificación de moléculas por su alta afinidad específica y como vectores de drogas u otros reactivos para combatir tumores.

Obtención de nuevas cepas por ingeniería genética

La década de 1970 marca el comienzo de la unión entre las técnicas bioquimicas para manipular el ADN *in vitro* con las técnicas genéticas para transferir el ADN de una célula a otra. La nueva metodología resultante conocida con el nombre de ingeniería genética ha revolucionado el campo específico de la Biotecnología. A través del procedimiento de clonado de ADN, genes de cualquier tipo pueden ser tomados de su ambiente natural, analizados, alterados y reinsertados en el mismo tipo de organismo o en otro diferente. Es así que la producción de solventes, productos químicos, hormonas, antígenos, enzimas y otras sustancias de interés farmacológico puede realizarse en grandes cantidades, a través del clonado de genes específicos en organismos que pueden ser desarrollados en escala industrial. Gran parte del éxito de una fermentación, como incrementar el rendimiento de un producto, aumentar su velocidad de formación, eliminar productos indeseables o la inhibición por un producto final, se puede alcanzar, al menos en principio, mediante el empleo de técnicas genéticas y estrategias que involucran metodología de ADN recombinante *in vitro.* Esta metodología ha contribuído además al conocimiento de las funciones del ADN, a la organización de los genes, a la regulación de la expresión y a la estructura primaria de proteínas.

El aspecto principal del clonado es la propagación de un fragmento determinado de ADN en una línea celular en crecimiento. Este fragmento, para poder propagarse debe ser unido a una molécula transportadora o vector el cual sí es capaz de multiplicarse en el huésped.

El clonado de genes ha sido posible gracias a una serie de descubrimientos fundamentales. En primer lugar la puesta en evidencia de enzimas denominadas endonucleasas de restricción, las cuales reconocen y cortan el ADN en sitios bien definidos, generando fragmentos de distintos tamaños, determinados por la distancia que separa cada sitio de restricción ubicado al azar sobre el genoma.

Existen distintos tipos de enzimas de restricción. Las enzimas de restricción de tipo II, catalizan la ruptura de dobles hebras en sitios donde reconocen secuencias de 4 o 6 bases de longitud. Se ha encontrado que los sitios de reconocimiento se leen igual en ambas hebras de ADN. En algunos casos la ruptura del ADN se produce en sitios opuestos de las dos hebras rindiendo fragmentos romos (Hae III), mientras que en otras ocasiones la ruptura se produce en forma de escalones, dejando extremos "cohesivos" (Eco RI) como se observa en la Fig. 5. En todos los casos la enzima hidroliza enlaces fosfo-diester en el lado 3' dejando extremos libres 3' -OH y 5' -fosfatos. Los extremos romos resultantes de un corte pueden transformarse en cohesivos añadiendo a los extremos 3', nucleótidos (poli A a uno y poli T al otro) por acción de una transferasa terminal.

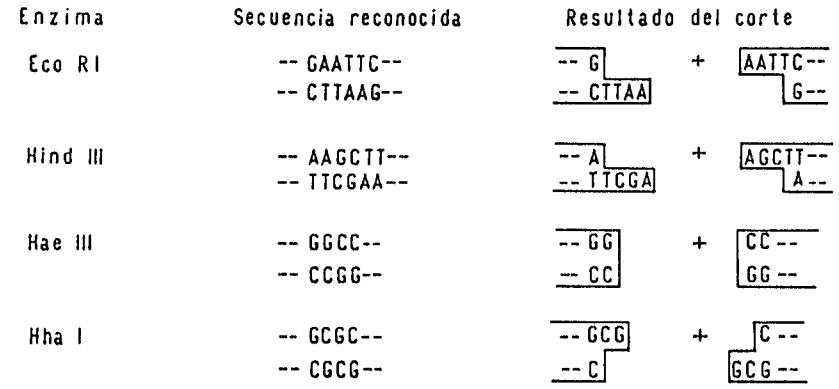


Figura 6. Secuencias y cortes de enzimas de restrición.
A: Adenina. G: Guanina. T: Timina. C; Citosina.

Otro de los avances fundamentales en esta tecnología fue el descubrimiento de enzimas que pueden unir extremos libres de hebras de ADN. Así moléculas separadas de ADN de doble hebra pueden ser ligadas ya sea por la ADN ligasa del bacteriófago T4 si los extremos son romos, o por la acción de la ligasa de E. *coli* o de T4 si son cohesivos.

Vectores de clonado

Para la transferencia y expresión de un ADN "extraño" en una célula huésped, se requiere de un vector de expresión, el cual debe ser capaz de entrar y replicarse dentro de ella. Un vector ideal debería ser pequeño, de fácil preparación y replicación en la célula huésped, no generar productos tóxicos para la misma, poseer uno o más marcadores (resistencia a drogas, etc.) para facilitar una rápida y positiva selección y contener al menos un sitio donde se pueda integrar el ADN extraño sin destruir una función esencial (replicación).

Los plásmidos son muy empleados como vectores. Son moléculas de ADN circular extracromosomal que se replican independientemente. Los que poseen genes para resistencia a antibióticos son de gran utilidad debido a que su adquisición por bacterias "competentes" es fácil de detectar. Uno de los más conocidos, el pBR322 posee sitios únicos de restricción y lleva genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina. Estos genes poseen sitios de restricción para la inserción de fragmentos de ADN, resultando luego de esta inserción en una inactivación del gen. En este caso la bacteria que reciba este plásmido, adquirirá la resistencia especificada por el otro gen intacto.

Los plásmidos que presentan un gran número de copias por célula, son los más empleados como vectores, debido a que al amplificar muchas veces el número de segmentos del ADN de interés, permiten incrementar los rendimientos del producto del o los genes que transportan.

En una célula la información genética está presente en dos formas diferentes, el ADN genómico y el ácido ribonucleico mensajero (ARNm), que posee la parte codante del gen sin el promotor. Estas dos formas pueden ser clonadas empleando dos estrategias distintas. El primer caso es el mostrado en la Fig. 6, donde el conjunto de colonias resultantes de la transformación representa la "biblioteca genómica" o "genoteca", de la cual habrá que extraer los clones de interés.

En el segundo caso a partir del ARNm se obtiene un ADN complementario (ADNc), como se observa en la Fig. 7 para un ARN eucariótico. Este ADNc se puede insertar posteriormente en un plásmido u otro vector.

En la formación de una genoteca para la expresión de genes de un organismo eucariótico, se debe tener en cuenta que en este caso el ADN genómico contiene secuencias que están ausentes en el ARN correspondiente. Los genes eucarióticos están constituídos por secuencias o regiones que no aparecen en el ARNm, denominadas "intrones" o "secuencias intervinientes" y por regiones presentes en el ARNm llamadas "exones". El número y tamaño de los intrones varía de un gen a otro, pudiendo encontrarse genes que carecen de ellos. En el proceso de transcripción, se obtiene un ARNm primario (localizado en el núcleo) que contiene tanto las secuencias de los exones como de los intrones, por éste sufre luego un proceso de "maduración" o modificaciones post-transcripcionales que involucran desde alteración química de bases individuales (metilaciones), adiciones al 5' ("caping") o 3' del transcripto (poliadenilación), hasta la forma más grande de procesamiento que involucra la separación de los intrones ("splicing"). Como consecuencia de estas modificaciones y procesamiento se obtiene como producto un ARNm funcional que será traducido a nivel ribosomal. Por lo tanto si se quiere obtener una proteína eucariótica en bacterias, es imprescindible obtener un ADNe al ARNm en cuestión, a partir del cual se llevará a cabo el donado.

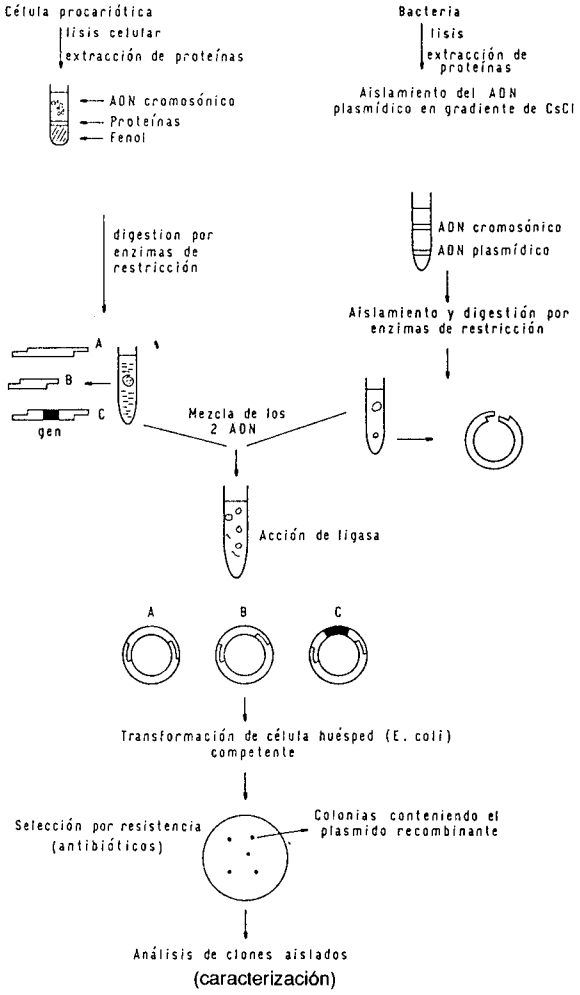


Figura 6. Esquema de clonado a partir de plásmidos.

El proceso de transformación por plásmidos se caracteriza en general por ser de baja eficiencia; por lo tanto para incrementar la misma se deben tener en cuenta una serie de factores: a) elección de una cepa huésped adecuada; en el caso de *E. coli* existen varias recomendadas (la mayoría de las cepas K12, MC 1061, C 600, DH 1, DH 5, IM 109, HB 101, etc); b) etapa de crecimiento, ya que la frecuencia de transformación es mayor cuando el cultivo de *E. coli* está en la mitad tardía de la fase exponencial; c) procedimiento de transformación empleado. En general existe un modelo lo que implica la obtención en un primer paso de células "competentes" mediante un tratamiento con una solución de $CaCl_2$ (50 mM) en frío, luego de lo cual las células se ponen en contacto con la solución del plásmido purificado incubando en hielo de 10 a 60 min. El porcentaje de células

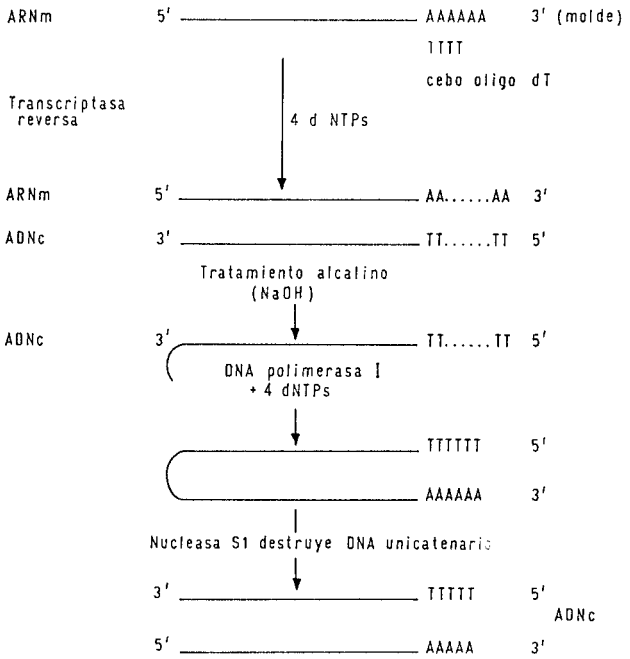


Figura 7. Obtención de ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc) a partir de ácido ribonucleico mensajero (ARNm).

competentes en una población tratada, oscila entre 0,01% y 10% de las células viables. La frecuencia de la transformación o eficiencia se puede determinar empleando un ADN standard (como pBR322) y puede oscilar entre 1 x 10^6 a 1 x 10^8 unidades formadoras de colonias mg-1 de ADN.

Una aclaración especial es la referida a la calidad de las drogas a emplear (en general reactivos para biología molecular) y los cuidados del operador para no "contaminar" las soluciones.

Otros vectores del clonado incluyen a los faltos k, los cuales poseen un número de ventajas que los hacen atractivos para el clonado. El cromosoma de este bacteriófago es una molécula de ADN lineal de 49 Kb de longitud, en el cual cerca del 40% no es esencial para su propagación. Fragmentos de ADN extraño de hasta 24 Kb pueden ser propagados empleando este vector, ubicando estos fragmentos en la región central del genoma, la cual contiene genes no esenciales. El reemplazo de estos es fundamental debido a que sólo genomas de 40-52 Kb pueden ser empaquetados dentro de las partículas del fago con alta eficiencia. Si sólo se ligan los dos extremos o brazos, la molécula de ADN obtenida es muy pequeña para ser empaquetada.

La molécula de ADN recombinante del fago puede ser introducida como tal en la célula bacteriana (transfección) con una eficiencia de 10^{-1} clones recombinantes ug-1 ADN o puede superar a 10^6 clones ug^{-1} si se realiza por infección, empaquetando previamente in vitro al DNA recombinante.

Si el objetivo es clonar grandes fragmentos de ADN pueden emplearse como vectores los cósmidos, que son elementos genéticos equivalentes a plásmidos de gran tamaño y encapsulados dentro de la cabeza de un fago para ser introducidos en las células. En los cósmidos se pueden introducir fragmentos de hasta 45 Kb, lo cual reduce el número de clones a obtener para disponer de una genoteca re-

presentativa. Como llevan el origen de replicación de un plásmido, se replican como tal dentro de la célula. Su desventaja es que por su gran tamaño,, su número de copias (como plásmido) en la célula es reducido.

Tamaño de la genoteca

Este es uno de los aspectos más importantes y que consiste en determinar aproximadamente cuántos clones es necesario disponer para tener una probabilidad p de contener una secuencia determinada de ADN. Se debe asumir una representación de secuencias al azar, que cada inserto es de igual tamaño y que el tamaño genómico del organismo sea conocido. Así, si "a" es el tamaño del inserto y "b" es el tamaño del genoma (en las mismas unidades), luego una genoteca de N clones tendrá una probabilidad p de contener determinada secuencia:

$$N = \frac{\ln (1 - p)}{\ln (1 - a/b)}$$

Así por ejemplo para E. coli con un geoma de $4.2x10^3$ Kb y si a = 20 Kb, si se fija p = 0.99 (99% de probabilidad de contener determinada secuencia), el valor de N será de 9.6×10^2 clones.

Identificación de clones de interés

La identificación de los clones de interés entre cientos o miles de clones representa un problema que demanda tiempo y que depende de la sensibilidad y especificidad del sistema de detección. Muchos métodos utilizan sondas radiactivas de gran especificidad que contienen secuencias complementarias al ADN de interés.

La identificación puede hacerse obteniendo una réplica de las colonias en un filtro, las cuales son posteriormente lisadas, el ADN fijado al filtro, hibridizado con la sonda y detectado por autoradiografía.

En otros casos se puede utilizar un vector de expresión que posea un operón dentro del cual se inserta al ADN. Si se dispone de un plásmido con un operón lactosa (lac) inducible, se puede insertar en fase el fragmento de ADN dentro del gen lac Z, obteniéndose así una proteína de fusión de la B=galactosidasa. Si la proteína de interés a producir es tóxica para la célula, esto se supera empleando células que elaboren represores del operón lac. Cuando la concentración celular del cultivo es elevada, se induce la expresión con isopropil-B-D-tiogalactopiranósido (IPTG), detectándose la presencia de la proteína de interés por métodos inmunológicos. Finalmente para aumentar la estabilidad de la proteína a producir, a la cual contribuye la estructura de la B-galactosidasa, se usan huéspedes deficientes en proteasas.

Perspectivas de la ingeniería genética

Además de E. col¡ como organismo huésped de genes extraños, se han utilizado Bacillus subtilis y levaduras como *Saccharomyces cereuisiae y Schizosaccharomyces pombe*, distintos *Streptoinyces* y *Agrobacterium tuinefaciens*. Finalmente también otras células como las vegetales pueden ser empleadas para la inserción de genes extraños.

Desde el punto de vista tecnológico se trata de favorecer la síntesis del producto del gen clonado, incrementando el contenido de copias del gen en la célula. En el caso de genes clonados en plásmidos, esto se logra aumentando el número de plásmidos, cuyo número de copias es regulado a través de funciones codificadas en su genoma; sin embargo esto tiene un límite. Numerosos estudios experimentales de recombinantes de *E. coli y S. cereuisiae* han demostrado que la presencia de plásmidos reduce la velocidad de crecimiento de la célula huésped y

concomitantemente la actividad de síntesis total de proteínas. Esto probablemente ocurra debido a una competición entre las actividades dirigidas por el plásmido y la célula huésped por precursores comunes, energía química, represores y activadores, enzimas, etc..

Esto se ha superado con el empleo de promotores regulables y controles sobre la replicación del plásmido, los cuales se manejan a través del medio de cultivo.

Se ha observado en muchos procesos que el producto del gen clonado en E. *coli* exhibe un máximo con respecto a un valor de u. Esto implica que existe un u óptimo para maximizar la producción en sistema continuo, dependiendo de la naturaleza del plásmido y la estabilidad del producto del gen.

Es evidente que el futuro es sumamente alentador. Como ya se mencionó, la combinación de la ingeniería genética con eficientes procesos fermentativos en gran escala, pueden suministrar un gran número de productos de interés industrial, los cuales pueden ser difíciles o imposibles de obtener a partir de sus fuentes naturales. Así es posible obtener hormona de crecimiento humano, inteferón, interleukina humana, insulina, la expresión en plantas de genes bacterianos para el control de plagas, antígenos para nuevas y más efectivas vacunas con menor reactogenicidad, como es el caso en hepatitis B, aftosa, etc..

También las manipulaciones genéticas se han empleado en el mejoramiento de la productividad en fermentaciones. Un ejemplo es la producción de treonina por un mutante de E. col¡ resistente a análogos, donde el operón entero de treonina fue introducido en un plásmido, el cual se incorpora al organismo por transformación. Su número de copias fue de aproximadamente 20 y la actividad de las enzimas del operón se incrementó de 40 a 50 veces. La cepa obtenida produce 30 $g\ l^{-1}$ más que la original.

Otro avance importante se logró mediante manipulaciones en Streptomyces, las cuales han permitido mediante la introducción de genes, la obtención de nuevos antibióticos.

Un aspecto fundamental de la tecnología es la selección de cepas estables, debido a que mutantes espontáneos que pueden aparecer tienen en general menores rendimientos y mayores valores de velocidad decrecimiento, por lo cual en fermentaciones largas ("batch" alimentado, continuo) podrían desplazar a la cepa original.

Evidentemente las nuevas cepas obtenidas deberán ser estudiadas en su comportamiento en gran escala, especialmente en lo relacionado con la estabilidad y niveles de producción.

Habiendo tratado ya los aspectos fundamentales referidos a los microorganismos consideraremos en el próximo capítulo los correspondientes a los medios empleados en las industrias de fermentación.

Lecturas recomendadas

1. *ADN recombinante. Introducción a la ingenieria genética.* J.D. Watson, J. Tooze, D.T.Kurtz. Ed. Labor, *1986.*
2. *Biotechnology. Vol. 1.* Microbial Fundamentals. Ed. H.J. Rehm, G. Reed, Verlag Chemie, *1981.*
3. *DNA cloning.* Volume I. A practical approach. Ed. D.M. Glover. IR L Press Limited *1985.*
4. *Genetics.* Geoffrey Zubay. Ed. The Banjamin/Cummings Publishing Company, Inc. *1987*
5. Methods in Microbiology. Ed. J.R. Norris, D.W. Ribbons. Vol. 3A. Academic Press *1970.*
6. *Principles of Fermentation Technology.* P.F. Stanbury and A. Whitaker. Pergamon Press, *1984*

Capítulo 4

MEDIOS DE FERMENTACION

La preparación de medios para el desarrollo de procesos de fermentación es una etapa fundamental para asegurar la productividad de los mismos.

Como ya se explicó, los componentes de los medios constituyen los efectores externos de naturaleza química que desempeñan un rol esencial en los procesos ya que deben cumplir con los requerimientos del crecimiento y de formación de productos y además suministrar energía para la síntesis de metabolitos y para el mantenimiento celular.

No obstante que los microorganismos varían considerablemente respecto de los nutrientes que pueden necesitar es posible efectuar la distinción de las siguientes categorías de componentes: a) Macronutrientes, agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg; b) Micronutrientes o elementos trazas representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co que se agregan a los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro; y c) Factores de crecimiento, que están constituídos generalmente por componentes orgánicos suministrados en baja concentración y que no son sintetizados ni metabolizados por las células, sino incorporados a estructuras celulares y de función metabólica específica, como vitaminas, algunos aminoácidos, ácidos grasos no saturados, etc..

Los medios pueden clasificarse, considerándo la naturaleza química de los componentes, en 1) medios sintéticos o medios químicamente definidos, y 2) medios complejos en cuya composición intervienen sustancias de origen animal o vegetal como peptonas, extracto de levadura, macerado de maíz, harina de soja, etc. que aportan las sustancias fundamentales ya mencionadas, pero que son químicamente indefinidas y de composición variable.

En el estudio de los medios de cultivo es conveniente considerar en primer lugar el diseño para tratar a continuación la formulación y optimización de los mismos.

Diseño

El diseño de un medio de fermentación tiene como finalidad la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos correspondientes al proceso a desarrollar. Con tal objeto se debe tener en cuenta todos aquellos aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos a ser empleados como son los requerimientos nutricionales del microorganismo y algunos específicos del proceso, la disponibilidad real de los componentes y consideraciones sobre las materias primas. Otros aspectos que son también importantes se refieren a todos los procesos y operaciones previos y posteriores a la etapa de fermentación y al conocimiento de los mecanismos bioquímicos que regulan la formación de algunos productos, como es el caso de la importancia del anión PO_4, según ya se explicó. Trataremos especialmente de los tres primeros.

Requerimientos nutricionales

Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, ya sea autotrófico, que corresponde a los microorganismos que ob-

tienen el carbono del $C0_2$ como las algas y algunas bacterias, y los heterotróficos que necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono. Otro factor esencial está determinado por las condiciones del cultivo, si es aerobio o anaerobio. El 0_2 es uno de los oxidantes más comunes en el metabolísmo energético. En la ausencia del 0_2, el NO_3 o SO_4 son utilizados como aceptores de electrones por algunas bacterias. Las bacterias metanogénicas son auxótrofos anaerobios que utilizan H_2 para reducir el $C0_2$ a CH_4 para obtener energía. Otras protistas obtienen su energía, en condiciones anaerobias por reacción de óxido-reducción realizadas sobre compuestos orgánicos. Las fuentes de carbono cumplen también el rol de ser fuente de energía.

Otro requerimiento nutricional está constituido por las fuentes de nitrógeno que pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. Para la síntesis de proteína se requieren en general L-aminoácidos, aunque también son necesarios algunos aminoácidos de la serie D como D-alanina y D-aspártico para su incorporación a la pared de la células. En algunos casos se requieren también póptidos de histidina.

Los requerimientos de otros macronutrientes como el P y el S son suministrados en forma de PO_4H y SO_4 (o aminoácidos azufrados). El fósforo se incorpora en ácidos nucleicos, y polímeros celulares. El S es asimilado para la síntesis de aminoácidos azufrados, y además se necesita para la biotina, coenzima A, tiamina y otros componentes.

Los requerimientos de K y Mg son también esenciales. Una parte importante del primero está unida al RNA de manera que los requerimientos de K aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA de las células, como la velocidad de crecimiento. El ión K actua como coenzima y probablemente actúa como catión en la estructura aniónica de varios componentes celulares. El ión Mg es esencial para la estabilidad de los ribosomas y actua como cofactor en numerosas reacciones del metabolismo. Tanto el K como el Mg se incorporan a los medios en forma de sales como fosfato y sulfato.

Con respecto a los micronutrientes se distinguen 2 categorías: a) Los que son frecuentemente esenciales para el crecimiento como Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn y b) los que son raramente esenciales como B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, e I. En general los requerimientos de trazas de elementos son conocidas cualitativamente. A veces es difícil demostrar un requerimiento de un micronutriente porque generalmente está presente en suficiente cantidad como impureza de los componentes principales. Los requerimientos de éstos compuestos pueden aumentar varias veces cuando el cultivo ha estado sujeto a "strees", como por ejemplo por aumento de temperatura por encima de un valor óptimo.

Los requerimientos de factores de crecimiento comprenden ciertos aminoácidos y vitaminas del grupo B como tiamina, riboflavina, ácido pantotético, niacina, etc., que representan para muchas bacterias y levaduras factores esenciales en los medios sin los cuales no se produce crecimiento celular. La mayor parte de las vitaminas son constituyentes de co-enzimas. Otros factores de crecimiento son las purinas, poliaminas, putrescinas, cte..

En algunos procesos existe la necesidad de efectuar otros agregados, a parte de los nutrientes requeridos por los microorganismos y que representan los requerimientos específicos del proceso considerado.

Un ejemplo es el caso de los precursores que constituye la base de una molécula que debe ser sintetizada por el microorganismo, como el ácido fenil acético

para la penicilina. Otro ejemplo es el agregado de ciclo dextrinas en procesos de producción de *Bordetella pertussis* que puede actuar como complejante de inhibidores de crecimiento celular. El agregado de cloruros o bromuros en el caso de algunos antibióticos como cloro y bromotetraciclinas, tetraciclidas producidas por el *Streptomyces aureofaciens,* responde también a requerimientos específicos para inhibir la síntesis de productos no deseados, como ocurre también con el agregado de mananos y barbitúricos en la producción de estreptomicina por *S. griseus.*

El agregado de sulfato, en el proceso de fermentación alcohólica, que favorece la formación de glicerol, es otro ejemplo de un requerimiento específico.

El diseño correcto tiene que ver con las características bioquímicas propias y evolución de los parámetros de cada proceso. Por ejemplo, un proceso caracterizado por un descenso continuo de pH, debido al uso de una sal de amonio como fuente de nitrógeno, obliga a considerar en su diseño algún agregado que no corresponda a una exigencia nutricional, como es el caso del control de pH del mismo. Este puede efectuarse por agregados al medio de agentes "buffer" como mezclas de fosfatos o de carbonato de calcio o como más generalmente se hace, con agregados periódicos de soluciones alcalinas que pueden efectuarse en forma más conveniente mediante un control automático de pH. El diseño de un medio específico para la producción de ácido cítrico debe considerar la influencia negativa que para el proceso tiene un exceso de hierro en su composición; por lo tanto dicho medio debe diseñarse de manera tal que su preparación (a partir de diversas materias primas) considere una eliminación total del hierro y posterior agregado del mismo en cantidades controladas.

Disponibilidad de los componentes

Aparte de su presencia en el medio de cultivo, los nutrientes deben estar disponibles para ser usados por la célula.

Es importante mencionar la disponibilidad correspondiente a iones metálicos cuya concentración es modificada por quelación, ya que muchos constituyentes del medio y productos del metabolismo actúan como agentes complejantes o precipitantes, por ejemplo aminoácidos, hidroxiácidos, hidróxidos, y los aniones $P0_4$ y $C0_3^{-2}$.

Por lo tanto, con el objeto de controlar su concentración y prevenir la precipitación de los iones metálicos, es necesario o esencial quelar el ion mediante algún agente quelante agregado, como el EDTA (Acido Etilendiaminotetraacético).

En medios complejos de uso industrial la situación es aún más complicada ya que existe una gran variedad de sustancias orgánicas, las cuales pueden quelar, secuestrar o absorber iones metálicos reduciendo la concentración iónica disponible. Entre dichos compuestos podemos citar: aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos, polifenoles, polifosfatos y materiales coloidales.

En general se puede decir que todo material insoluble presente en el medio de cultivo va a tener una determinada capacidad de unión a elementos metálicos disminuyendo su concentración efectiva, como ocurre también con los aminoácidos y proteínas que tienen los grupos reactivos $R\text{-}COO^-$, RHN^-, RS^-, RO , que son los más importantes. La dinámica de formación del complejo está determinada por la constante de equilibrio de formación del complejo metal-ligando, y por la velocidad a la cual el equilibrio es obtenido. La constante de equilibrio para la formación del complejo del ión metálico (M) con el ligando (L) se expresa de la siguiente forma:

$K = \frac{[M\,L]}{[M]\,[L]}$ donde las cargas del catión y ligando están omitidas.

El valor de K es prácticamente independiente de la naturaleza del ligando, ya que depende particularmente del ion metálico. Se puede hacer una lista de términos de valores decrecientes de la constante de equilibrio como sigue: $Fe^{+3} > Pb^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{3+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+} > Na^{+} > K^{+} >$ y de la cual se puede deducir, por ejemplo, que el ion Cu^{2+} estará fundamentalmente como complejo mientras que Ca^{2+} Na^{+} y K^{+} estarán en forma de iones metálicos libres.

Por otro lado la velocidad a la cual se alcanza el equilibrio tiene también una serie de orden decreciente de velocidades de acuerdo al ion: $Sr^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} > Ni^{2+}$. De ambas consideraciones surge por ejemplo que cuando se alcanza el equilibrio el ion Ca^{2+} estará casi siempre libre para ser utilizado y si está complejado se hará rápidamente disponible, en cambio el Mg^{2+} estará generalmente libre pero si está complejado se hará disponible muy lentamente. En la misma forma se puede deducir que el Co^{2+} estará fundamentalmente en forma complejada siendo disponible además a muy baja velocidad. Por esa razón ese elemento es potencialmente limitante.

En conclusión, es importante tener en cuenta la naturaleza de los compuestos orgánicos que tienen capacidad para actuar como ligandos, y sobre todo el ion metálico considerado, ya que la concentración libre de éste es lo que interesa.

Materias primas fundamentales

Los componentes empleados en la industrias de fermentación son generalmente complejos, siendo importante considerar diferentes aspectos como el costo de los mismos, la disponibilidad y la estabilidad en su composición química. Si tenemos en cuenta que el costo de los nutrientes representa entre al 10 y el 60% del costo total de mucho productos obtenidos por fermentación, se hace prioritario disminuir el costo de los medios.

Las materias primas más importantes corresponden a fuentes de carbono y de nitrógeno.

Las fuentes de carbono pueden ser: 1) Hidratos de carbono como glucosa o dextrosa, sacarosa, lactosa, almidón, dextrina; 2) Alcoholes como el glicerol y manitol; y 3) Hidrocarburos como hexadecano, octadecano y otros. Son muy importantes también por su disponibilidad y costo reducido otras materias primas que contienen hidratos de carbono como granos, melazas, celulosas, suero de queso, etc. También se pueden emplear otros subproductos o efluentes de industrias que por su contenido en fuentes de carbono son interesantes para algunos procesos como las vinazas de destilería, alpechín y residuos sulfiticos, que son sin embargo solamente útiles para procesos de producción de biomasa destinados al consumo animal, ya que si bien contienen hidratos de carbono y otras fuentes de carbono asimilables por los microorganismos, también contienen muchas impurezas que impiden su utilización en otros procesos por las dificultades y costo elevado que presentan las operaciones de separación y purificación de los productos.

Las fuentes de nitrógeno de naturaleza inorgánica más comunes son el amoníaco o las sales de amonio. Las orgánicas están representadas por varios productos, como ser: 1) Hidrolizados de proteínas (Peptonas) que son obtenidas por hidrólisis ácida o enzimática de distintas fuentes proteicas como carne de diferentes órganos y animales, pescado, caseína, gelatina, harina de soja, algodón, girasol, etc.. Mediante ajuste de la relación enzima-sustrato y variando tiempo de

hidrólisis es posible variar el tamaño de la cadena de polipéptidos. Aparte de su función como fuente nitrogenada, las peptonas aportan algunas vitaminas y sales inorgánicas como fosfatos y suministran también algunos micronutrientes como Ca, Zn, Fe y Cu. 2) Extracto de carne, que se obtiene por extracción acuosa y concentración posterior variando su tipo de acuerdo a la calidad de carne, tiempo de extracción y temperatura de la misma. 3) Extracto de levadura, que es disponible en forma de pasta o polvo, y puede ser obtenida mediante autólisis o plasmólisis de la levadura, es básicamente una mezcla de aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en H_2O y carbohidratos. 4) Extracto de malta, que es el extracto soluble en H_2O de la malta de la cebada y 5) "Cornsteep", el agua de maceración de la industria del maíz tiene mucha importancia por su utilización como componente esencial de los medios para la producción de varios antibióticos y enzimas.

Es muy importante también la correcta elección de una determinada fuente cuando se presentan varias alternativas posibles. En este sentido deben considerarse los costos, la disponibilidad y el problema de impurezas que puede acompañar a las distintas materias primas utilizadas.

Formulación

La formulación tiene que ver con los aspectos cuantitativos de los medios, es decir debe establecer las concentraciones de cada componente a ser utilizadas.

Una primera aproximación con respecto a las cantidades a utilizar de las diversas fuentes lo da el conocimiento de la composición de biomasa del microorganismo a ser empleado. Una composición elemental y típica de la biomasa es (en % de peso seco): Carbono, 46-48; Nitrógeno, 7-12; Fósforo, 1-3; Azufre, 0.5-1.0; Mg, 0.5-1%. Es decir, que si queremos formular un medio para producir una determinada cantidad de biomasa debemos promveer las distintas fuentes que aseguren como mínimo las cantidades de elementos que deben ser suministrados. La composición de un medio mínimo basado en este principio, que además tiene en cuenta los requerimientos de las fuentes de energía, figura el la tabla 3, que ha sido calculada por Pirt para la producción de *Klebsiella aerogenes* en concentración de 10 gl^{-1}.

Tabla 3. Composición de un medio mínimo para *Klebsiella aerogens* (Adaptado de Pirt)

Componente	Elemento provisto o función	Masa del Componente (g)
Glucosa	C, Energía	22.7
NH_4Cl	N	4.37
KH_2PO_4	P + K	1.13
$MgSO_4.7H_2O$	S + Mg	0.232
$CaCl_2.2H_2O$	Ca	0.011
$FeSO_4.7H_2O$	Fe	0.007
$MnSO_4.4H_2O$	Mn	0.002
$ZnSO_4.7H_2O$	Zn	0.002
$CuSO_4.5H_2O$	Cu	0.0004
$CoCl_2.6H_2O$	Co	0.0004
EDTA, Sal disódica dihidrato	Agente quelante	0.394
H_2O (destilada)		1,000 ml

Por el conocimiento de la estequiometría de crecimiento y de formación del producto, es posible formular adecuadamente un medio. Aunque este tema se tratará en el capítulo 5 es conveniente adelantar aquí algunos aspectos necesarios. En general podemos escribir para cualquier proceso de fermentación:

Fuente de C + fuente de N + 0_2 + minerales + nutrientes específicos ⟶ biomasa + productos + $C0_2$ + H20.

Supongamos que queremos formular un medio para la producción de biomasa de levadura de panificación. En este caso se puede establecer la siguiente ecuación basada en la estequiometría:

$$0.585\ C12\ H22\ O_{12} + 3.205\ 0_2 + 0.61\ NH3 \longrightarrow \underset{\text{(Biomasa)}}{C_{3.72}\ H6.11O_{1.95}N_{0.61}} + 3.30\ C0_2 + 4.29\ H_2O + 387\ \text{Kcal.}$$

(Sacarosa)

La ecuación anterior representa así la formación de 100 g de biomasa a partir de 200 g de sacarosa. Debe aclararse que en la "fórmula" de la levadura que representa lo composición centesimal de la misma faltan los elementos menores como el P, el S y el Mg por lo cual la suma no da 100 g sino 90.46. Más adelante veremos que es conveniente utilizar en lugar de la fórmula centesimal la correspondiente a la fórmula mínima que resulta de dividir el porcentaje de cada elemento po 3.72, o sea haciendo uno al carbono. La ecuación mencionada fue establecida por Harrison y se ha comprobado que responde muy satisfactoriamente en la práctica. En este caso se considera que toda la fuente de carbono se emplea para la formación de biomasa y de $C0_2$, que se desprende sin formación de otros productos.

En la misma forma se pueden establecer balances de materia para otras reacciones que incluyan productos y deducir de las mismas la cantidades de biomasa y productos que se pueden obtener a partir de una determinada cantidad de fuentes de carbono y de nitrógeno. Las otras fuentes de elementos menores y factores no son necesarios de incluir en las ecuaciones.

Aplicando este criterio podemos establecer entonces que para obtener una determinada concentración de biomasa, por ejemplo 30 gl^{-1}, debemos formular el medio como mínimo con 60 gl^{-1} de fuentes de carbono asimilable, que es en el caso anterior la sacarosa. Con respecto a las fuentes de nitrógeno, ésta debe estar en concentración tal como para satisfacer la ecuación anterior, que es 0.61 moles de NH_3 o sea 10.37 g de amoníaco, lo que representa 8.54 g de N_2. Ya tenemos por lo tanto la cantidad de la otra fuente fundamental a ser agregada. Del conocimiento de la composición centesimal de otros componentes menores podemos establecer así las cantidades a agregar.

Ahora bien, sabemos por otra parte que la levadura necesita para crecer algunas vitaminas del grupo B como la biotina, tiamina, ácido pantoténico, etc. Esas vitaminas deben estar por lo tanto presentes en el medio. Como el proceso de producción de levadura es un proceso industrial que interesa desarrollar con costos de producción mínimos, es conveniente estudiar las fuentes de carbono, nitrógeno y de vitaminas y minerales más económicos y disponibles que podamos encontrar. Surge así la elección lógica de las melazas de caña de azúcar o de remolacha que reunen la mayor parte de las condiciones. Del conocimiento del efecto Crabtree ya comentado y para evitar la formación de alcohol y maximizar la producción de biomasa surge la necesidad de implementar una alimentación programada empleando melaza como sustrato limitante, de lo cual resulta la elección de un sistema de "batch" alimentado para la producción. Mayores detalles de este proceso se darán en el capítulo 8 relacionado con producción de levadura.

Mediante el conocimiento de los coeficientes de rendimiento para la formación de biomasa y producto y los valores de la energía de mantenimiento (aspectos a tratar en el capítulo 5) será posible establecer también los requerimientos de las fuentes de carbono necesarios para formular un medio.

Optimización

Pueden ocurrir situaciones en las cuales sea imperativo la optimización de los medios de cultivo. Entre ellas podemos mencionar las siguientes: 1) No existencia de información respecto a coeficientes de rendimiento de macro y micro elementos para el cultivo del microorganismo determinado. 2) Existencia de limitaciones nutricionales ocultas, especialmente de microelementos y factores de crecimiento. 3) Uso de medios de cultivo conteniendo elementos en exceso respecto de los requerimientos nutricionales del microorganismo en cuestión, que pueden causar inhibición del crecimiento. 4) Ensayo de sustancias estimulantes, activadoras e inhibidoras del crecimiento y formación del producto. 5) Empleo de fuentes nutricionales no convencionales.

La metodología más elemental consiste en realizar experimentos, en los cuales se varía la concentración del componente a ensayar manteniéndose constante las concentraciones de los demás ingredientes. Para organismos aerobios generalmente se utiliza como sistema de cultivo erlenmeyers agitados. En este caso, se analiza el efecto de la variable escogida sobre la velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa obtenida.

Si bien el procedimiento anterior es simple, es evidente que hace falta una gran cantidad de trabajo preliminar ya que el operador no conoce de antemano que nutriente es el limitante del crecimiento. Cuando son varios los posibles nutrientes limitantes el método resulta poco práctico. Por otra parte puede ocurrir que la respuesta obtenida al variar la concentración de un componente deperida de los niveles de los otros, o sea, se produzca interacción entre componentes. Se puede mejorar mucho la optimización en batch empleando técnicas estadísticas o utilizando sistemas continuos con pulsos de componentes. Utilizando cultivos continuos (tema que se verá en el capítulo 6) es posible obtener un cultivo limitado por un sólo factor o sustrato a lo largo de todo el experimento, pudiéndose conocer por lo tanto el efecto que su variación ejerce sobre el cultivo al mantenerse los demás componentes constantes. En la fig. 8 se muestra la optimización de un medio lograda por el método de los pulsos trabajando con un cultivo continuo y en el cual se gráfica la variación de la concentración de biomasa en función del tiempo después del pulso de un componente dado.

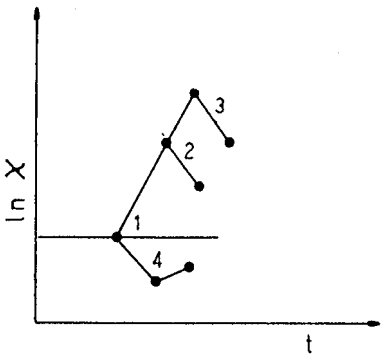


Figura 8. Optimización de medios de fermentación. 1. Nutriente no limitante. 2. Nutriente limitante. 3. Nutriente limitante a mayor concentración. 4. Nutriente tóxico.

Esterilización

Es conveniente, al tratar este tema, dar una definición clara del término y de otros relacionados, ya que a veces suelen producirse confusiones.

Esterilización significa la eliminación de toda forma de vida de un medio o material, lo que se lleva a cabo generalmente por medios físicos, por ejemplo, filtración, o por muerte de los organismos por calor, productos químicos u otra vía.

Esta definición excluye por lo tanto cualquier técnica que resulte solamente en un daño a los microorganismos o atenuación de la actividad de cualquier tipo.

La palabra *desinfección* se aplica a la remoción o destrucción por cualquier vía de organismos vivos que pueden causar daño particular o infección. No significa por lo tanto la destrucción de todos los microorganismos, sino solamente de aquellos que pueden producir un resultado no deseado.

Un antiséptico es un desinfectante, o sea un agente químico usado para destruir microorganismos dañinos. Se utiliza en general para agentes a ser aplicados en animales o humanos.

Asepsia es la exclusión continuada de microorganismos contaminantes. Así por ejemplo el cultivo de microorganismos en el laboratorio es llevado a cabo asépticamente como en muchas fermentaciones industriales. El medio de cultivo es esterilizado para remover toda forma de vida y luego inoculado con el cultivo requerido. Se dice entonces que el sistema se mantiene en condiciones asépticas.

Pasteurización es el término aplicado al proceso que se utiliza para la destrucción de algunos de los microorganismos posiblemente presentes en materiales sensibles al calor como la leche y cerveza. Consiste en calentar la leche, por ejemplo a 62 °C, mantenerla a esta temperatura 30 minutos y después enfriarla lo más rápidamente posible. Esta técnica no es de ninguna manera un procedimiento de esterilización. Es solamente un método para destruir organismos patógenos y al mismo tiempo disminuir el nivel de aquellos organismos que más pueden deteriorar la leche.

La razón fundamental para efectuar la esterilización en Microbiología Industrial es para evitar la competición por los nutrientes en medios de cultivo y permitir así que el cultivo de microorganismos específicos que se utilizan en un proceso de fermentación de los rendimientos esperados en biomasa y/o metabolitos específicos.

Métodos de esterilización

Los métodos de esterilización pueden ser de 3 tipos: a) por destrucción total de microorganismos; b) Por muerte o inactivación; y c) Por eliminación con medio físicos.

Por destrucción total se entiende un proceso muy violento, que casi siempre implica calentamiento apreciable del material, como ocurre con la aplicación de una llama, que es lo que hacemos en el laboratorio cuando flameamos un ansa de platino olas bocas de tubo de ensayo o erlenmeyers. Otra manera de destruir contaminantes es con el uso de poderosos agentes oxidantes. Por supuesto ésta metodología, aunque es efectiva, está muy restringida en su empleo.

La muerte o inactivación significa la eliminación de microorganismos sin que exista necesariamente desintegración de las células. Se puede efectuar por calentamiento, seco o húmedo, por radiaciones o por agentes químicos. El calor húmedo, generalmente en forma de vapor bajo presión, es muy útil y de gran valor en la esterilización en el laboratorio, que se efectúa en autoclave, o en la industria cuando se esterilizan los medios de cultivo y los equipos de fermentación. En el caso de los autoclaves, se pueden alcanzar presiones de 1 a 3 atmósferas. En escala grande el equipo de producción es esterilizado con vapor saturado bajo presión, y la presión requerida debe ser alcanzada en todas las partes del equipo y el aire debe ser purgado totalmente del sistema (como ocurre también en el caso de los autoclaves) porque la transferencia de calor disminuye mucho en ese caso. Después de la esterilización se mantienen las condiciones asépticas, haciendo pasar vapor por las válvulas y sellos.

La eliminación física está restringida a la esterilización de gases líquidos, y es fundamentalmente llevada a cabo por filtración mediante filtros absolutos o filtros fibrosos.

Los filtros absolutos son de materiales cerámicos, de vidrio o de metal sinterizado con poros tan pequeños que la penetración de los microorganismos no es posible.

Los filtros fibrosos no son absolutos y el material filtrante puede ser lana de vidrio, amianto y esteres de celulosa, siendo las fibras de un diámetro variable de 0.5 a 15 micrones.

Cinética de la esterilización por calor

La cinética de la esterilización por calor húmedo, que es la única que consideraremos en ésta monografía por su aplicación a la esterilización de medios de fermentación, está caracterizada bastante aproximadamente por una reacción cinética de primer orden.

Si N_o es el número de organismos viables presentes inicialmente y N es número viable al final tendremos que la ecuación de velocidad de muerte será:

$$-\frac{dN}{dt} = kN \quad (1)$$ e integrando entre los límites

N_o a tiempo = 0 y N al tiempo t = t, se obtiene

$$\ln \frac{N_o}{N} = kt \quad \text{ó} \quad \ln \frac{N}{No} = -kt \quad (2)$$

N/N_o es la fracción de organismos viables que sobreviven después del tratamiento por calor durante el tiempo t y K = constante de velocidad de destrucción, que depende de la temperatura según la clásica ecuación de Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}} \quad \text{ó} \quad \ln k = \ln A - \frac{E}{RT} \quad (3)$$

donde A = constante
E = energía de activación
R = Constante general de los gases
T = Temperatura en grados Kelvin

Si se gráfica el In k en función de 1/T se obtendrá una línea recta, siendo la inclinación igual a -E/R y la intersección de la recta con la ordenada, el valor de la constante de Arrtherius.

La ecuación de velocidad de muerte necesita una aclaración, ya que la misma no admite una disminución del número de organismos a cero, porque si N es cero, t debería ser infinito. Para resolver este problema supongamos que N = 0.1 y calculemos el valor correspondiente de t. No podemos decir que después de ese tiempo sobrevivirá una décima parte de un microorganismo, pero si podemos decir que habrá sólo una probabilidad de 1 en 10 de que sobreviva un microorganismo. Ya veremos que por razones de seguridad podemos fijar el valor de N = 0.001 o sea fijar una probabilidad de 1 en 1000 de sobrevivencia.

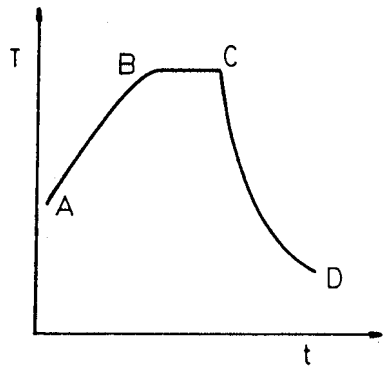


Figura 9. Variación de la temperatura en función del tiempo en un proceso de esterilización en batch.

La figura 9 muestra una curva típica de la esterilización en "batch" de un medio en un fermentador. La curva AB representa la etapa de calentamiento, la parte BC corresponde a la etapa de mantenimiento y CD es la etapa de enfriamiento. Durante la primera y última etapa ocurre parte de la destrucción térmica de organismos presentes en el medio debido a que se alcanza temperatura elevada sobre todo en la última parte de la curva AB y la primera parte de la curva CD. Se considera que la temperatura a partir de la cual se produce destrucción de esporos es 100 °C. Por lo tanto tendremos eliminación de esporos de 100 a 120 °C durante la etapa de calentamiento y de 120 a 100 °C durante la correspondiente al enfriamiento. Los tiempos de calentamiento y enfriamiento varían de acuerdo al volumen del equipo. En fermentadores industriales de 60.000 1 por ejemplo esos tiempos están en el orden de 28-30 min. y 11-14 min. para los períodos de calentamiento y enfriamiento respectivamente.

En la práctica de la esterilización es necesario tener presente que la calidad nutriente del medio debe ser preservada todo lo posible, razón por la cual, es imprescindible diseñar un ciclo de esterilización lo más efectivo posible pero al mismo tiempo lo más corto posible.

Podremos definir un término nabla (V) que representa la magnitud de la disminución del número de organismos viables de manera que:

$$\nabla = \ln \left(\frac{N_o}{N}\right) = kt$$

Y por tanto

$$\nabla = At\, e^{-\frac{E}{RT}}$$

Sin embargo, como ya dijimos, parte de la destrucción ocurre en la etapa de calentamiento y otra parte en la de enfriamiento , de manera tal que:

$$\nabla_{total} = \nabla_{cal} + \nabla_{mant} + \nabla_{enfriam.}$$

Las partes ∇_{cal} y $\nabla_{enfriam.}$ son obtenidas a temperatura variable de manera tal que es necesario integrar la ecuación:

$$kdt = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}}\, dt$$

para el período de calentamiento y de enfriamiento con el fin de calcular la cantidad de esporos que se eliminan durante ambos períodos. Conociendo el valor inicial de esporos presentes en el volumen de medio considerado es posible calcular el tiempo de mantenimiento a 120 °C para la esterilización completa del mismo.

Existen datos, en bibliografía, de cálculo de tiempo de mantenimiento para la esterilización de 45,000 1 de medio (con un valor de $N_o = 2 \times 10^7$ esp/ml) que demuestra que son necesarios solamente 8.8 min como tiempo de mantenimiento a 120 °C.

Debe tenerse en cuenta que estas consideraciones son válidas para el cálculo del tiempo de esterilización mínimo, a 120 °C, en fermentadores industriales del volumen considerado. En el caso del laboratorio cuando utilizamos un autoclave y deseamos esterilizar distintos recipientes con volúmenes diversos de medio, el tiempo de calentamiento y de enfriamiento no son generalmente considerados, salvo en el caso de equipos que tengan un período de calentamiento y de enfriamiento prolongado, los que por otra parte no son recomendados para su uso en el laboratorio. Lo que es importante en este caso es el tipo de recipiente, su geometría y el volumen de medio a esterilizar.

El tiempo de esterilización (o sea el tiempo de mantenimiento a 120 °C) requerido por ejemplo para tubos de ensayo de 18 x 50 mm es de 12-14 min y para tubos de 38 x 200 mm, de 15-20 min. Erlenmeyers de 2000 ml requieren de 30-35 min mientras que si son de 125 ml el tiempo es de 12-14 min. En cambio un frasco pyrex cuadrado de 1000 ml requiere 30-35 min y una botella de suero de 9000 ml 50-55 min. Estos tiempos aseguran la eliminación de esporos bacterianos de las especies más resistentes.

Conservación de la calidad nutriente

Como ya dijimos anteriormente, los medios de fermentación utilizados en la industria son casi siempre complejos y a menudo con sólidos en suspensión, de manera tal que los cambios que se producen durante la esterilización pueden ser importantes. A veces puede haber modificaciones beneficiosas o perjudiciales dependiendo del tiempo de esterilización.

Existen casos en los cuales si se prolonga la esterilización 50 a 60 min se producen pérdidas de rendimiento que llegan hasta el 65% con respecto al medio normal. En ciertos casos cuando el tiempo es solamente de 15-20 min se puede producir un efecto beneficioso.

La naturaleza de las interacciones que tienen lugar entre los componentes de un medio, durante la esterilización por calor, dependerá no solamente de la naturaleza de los componentes sino también de la temperatura, duración del calentamiento, pH del medio, y de la agitación. Un ejemplo típico de interacción es la reacción de Maillard que tiene lugar entre los grupos carbonilos de los azúcares con los grupos amino de proteínas, aminoácidos, etc. Se forman así productos de condensación con lo cual se inactivan significativas cantidades de carbohidratos y nitrógeno amínico. Por ese motivo es necesario que los carbohidratos se esterilicen por separado de los compuestos nitrogenados orgánicos.

Las sales de NH_4^+ se deben autoclavar a pH 7 o menor, si no el amonio se volatiliza. En medios químicamente definidos se puede observar pérdida importante de magnesio, potasio, amonio, sodio y fosfatos por precipitación de sales poco solubles como $MgNH_4PO_4$, $MgKP0_4$ y $MgNaP0_4$. Es importante por lo tanto autoclavar las sales de calcio y magnesio aparte de los fosfatos.

Los aminoácidos y factores de crecimiento son muy lábiles al calor. Entre los aminoácidos, el triptofano, glutamina, asparagina, y entre las vitaminas hidrosolubles, la tiamina, riboflavina y piridoxina son las más susceptibles de sufrir descomposición. En todos estos casos es aconsejable disolverlas separadamente en pequeños volúmenes de H_2O y luego esterilizarlas por filtración.

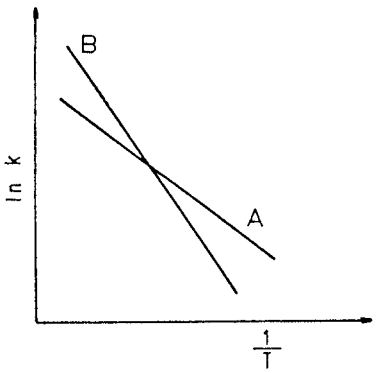


Figura 10. Relación entre k y la inversa de la temperatura para reacciones de baja y alta energía de activación.

Como ya dijimos es fundamental, además de esterilizar correctamente los medios, conservar al máximo la calidad nutriente de los mismos. En la misma forma que la inactivación de microorganismos puede ser considerada una reacción cinética de primer orden, también la destrucción de algunos compuestos sensibles al calor puede ser tratada en la misma forma.

La energía de activación de tales reacciones está generalmente en el rango de 10,000-30,000 cal.mol^{-1} mientras que la correspondiente a la destrucción térmica de esporos es superior (65,000-85,000 cal. mol^{-1}). Una representación gráfica daría una línea recta para ambos casos con valores distintos de pendientes según se aprecia en la Fig. 10.

La figura muestra que a medida que la temperatura aumenta, el valor de k para la reacción con baja E (curva A) aumenta más lentamente que en el otro caso. Esto significa que un aumento de la temperatura acelera la destrucción de esporos más que la degradación de nutrientes. Recordando la ecuación anterior:

$$kt = \ln \frac{N_o}{N}$$

vemos que el tiempo requerido para la destrucción de esporos decrece en proporción al aumento de k. Por lo tanto si se emplea alta temperatura para la esterilización se requiere un tiempo menor, por lo cual se concluye que la esterilización llamada de alta temperatura-corto tiempo favorece la conservación de la calidad nutriente al mismo tiempo que produce la destrucción efectiva de los esporos.

Es necesario aclarar que el uso de alta temperatura con tiempos cortos en escala grande implica necesariamente el empleo de un sistema de calentamiento y enfriamiento continuo en lugar de proceso de esterilización en batch.

En los próximos tres capítulos trataremos los aspectos básicos correspondientes a estequiometría, cinética de crecimiento y formación de productos, sistemas de cultivo y aspectos generales de biorreactores.

Lecturas recomendadas:

1. *Principles of Microbe and Cell Cultivation.* S.J. Pirt. Blackwel l Scientific Publications, *1975.*

2. *Introduction to Industrial Sterilization.* J.W. Richards. Academi c Press, 1968.

Capítulo 5

CRECIMIENTO MICROBIANO

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el crecimiento se detiene. También puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna substancia inhibidora formada por los mismos microorganismos, pero supóngase por ahora que éste no es el caso y que la primera alternativa es la válida. Luego hay dos aspectos claramente diferenciables que hacen al crecimiento microbiano: uno *estequiométrico,* por el cual la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y el otro *cinético,* el que dirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso.

Estequiometría del crecimiento microbiano

La aplicación de la estequiometría requiere conocer los rendimientos. Estos se definen como la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido (usualmente la fuente de carbono y energía). Por ejemplo el rendimiento celular se define como:

$$Y_{x/s} = -\frac{dX}{dS} \qquad (1)$$

X y S representan la concentración de biomasa y sustrato respectivamente.

En la práctica, para el cálculo del $Y_{x/s}$ se emplea la expresión:

$$Y_{x/s} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \qquad (2)$$

En el capítulo 4 se vio que para obtener 30 gl^{-1} de levadura para panificación, se consumían 60 gl^{-1} de fuente carbonada, luego el rendimiento será

$$Y_{x/s} = 0.50.$$

Si además de microorganismos se forma algún producto en particular, el rendimiento en producto estará dado por:

$$Y_{p/s} = -\frac{dP}{dS} \qquad (3)$$

Antes de avanzar en el tema, convendrá hacer algunas consideraciones sobre la composición elemental de los microorganismos con respecto a los elementos mayoritarios (C, N, H, O) ya que la misma será el punto de partida para realizar los cálculos estequiométricos. Además, y antes de aplicar los balances estequiométricos deberemos responder a esta pregunta: ¿qué peso de células (o biomasa) corresponde a "un mol"?.

Se ha encontrado que la composición elemental de un microorganismo dado durante un cultivo no se modifica mayormente y, lo que es más, las composiciones elementales de distintos tipos de microorganismos (bacterias y hongos) son semejantes. De este modo se puede definir un "microorganismo promedio" como aquél cuya composición es (% p/p): C = 46.5; H = 6.49; 0 = 31.0; N = 10.85, siendo el contenido de sales aproximadamente 5%. Es importante recalcar que si bien la composición elemental de la biomasa se mantiene constante durante el cultivo, no ocurre lo mismo con la composición macromolecular, esto es: proteínas, ácidos nucleicos, cte., la cual puede variar sensiblemente.

Teniendo en cuenta la composición media anterior, es posible escribir la "fórmula mínima" de un microorganismo promedio como: $CH_{1.79}O_{0.5}N_{0.2}$ (en la que está representado el 95% p/p de la biomasa) y con fines netamente prácticos definir "un C-mol de biomasa" como la cantidad de biomasa que contiene un átomo gramo de Carbono.

Luego:

$$1\ \text{C-mol de biomasa} = \frac{12 + 1.79 + 16 \times 0.5 + 14 \times 0.2}{0.95} = 25.8\ \text{g}$$

Por tanto una concentración de X en gl^{-1} de biomasa es equivalente a X / 25.8 C-mol de biomasa l^{-1}, o bien X_{ox} / 12 C-mol de biomasa l^{-1}. Donde ox es la fracción de Carbono de la biomasa (0.465 para el "microorganismo promedio"). Esta última forma de calcular los C-moles de biomasa es ventajosa ya que sólo requiere conocer ox; un dato que se puede obtener fácilmente de la bibliografía. En caso de no existir datos disponibles, se puede suponer ox = 0.465 sin temor a cometer errores groseros.

De forma análoga a la anterior se definen 1 C-mol de fuente de Carbono y energía, y también 1 C-mol de producto. Por ejemplo para la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) 1 C-mol de glucosa estará representado por CH_20 y pesará 30 g, mientras que 1 C-mol de etanol (C_2H_60) estará representado por $CH_3O_{0.5}$ y pesará 23 g. En general para un compuesto de la forma $C_n H_l O_q N_m$, 1 C-mol estará representado por $C H_{l/n} O_{q/n} N_{m/n}$.

En base a lo anterior, el crecimiento puede representarse mediante la siguiente "reacción química", en la que supondremos que el NH_3 (o alguna sal de amonio) es la fuente de nitrógeno:

Fuente de C y energía		**Biomasa**		**Producto**

$$C H_{s1} O_{s2} + Q NH_3 + bO_2 \longrightarrow y_{x/s}\, C H_{b1} O_{b2} N_{b3} + y_{p/s}\, C H_{p1} O_{p2} N_{p3} + y_{co_2/s}\, CO_2 + W H_2O + q\ (\text{calor})$$

Debe notarse que en esta ecuación todos los coeficientes estequiométricos están referidos a 1 C-mol de fuente de Carbono y energía (fuente C y E).

El valor de $y_{x/s}$ representa los C-moles de biomasa *formada* por cada C-mol de fuente de C y E *consumida.,* el de b los moles de 0_2 *consumido* por cada C-mol de fuente de C y E *consumida,* etc.

Ya se ha visto que $Y_{x/s}$ e $Y_{p/s}$ son los rendimientos en biomasa y en producto respectivamente. Son parámetros de importancia fundamental dentro de la microbiología industrial, pues dan una medida de la eficiencia del proceso de pro-

ducción. De este modo en un proceso destinado a la producción de biomasa, el objetivo será maximizar $Y_{x/s}$ y minimizar $Y_{p/s}$. Si lo que interesa es el producto, se tendrá el caso inverso. Los valores de $y_{x/s}$ e $y_{p/s}$ se calculan a partir de $Y_{x/s}$ e $Y_{p/s}$ mediante las expresiones:

$$y_{x/s} = Y_{x/s} \frac{\sigma x}{\sigma s} \qquad (4)$$

$$y_{p/s} = Y_{p/s} \frac{\sigma p}{\sigma s} \qquad (5)$$

Antes de efectuar los balances de materia y energía, introduciremos un nuevo concepto que nos permitirá simplificar los cálculos: el *`grado de reducción"* al que denotaremos con la letra y.

Un par de ejemplos servirán para aclarar el significado de y. En la tabla 4 pueden observarse los valores de y para la oxidación de 1 C-mol de distintos compuestos orgánicos a $C0_2$ y H_2O, como así también el calor de reacción.

Tabla 4. Entalpía de combustión referida a 1 C-mol en condiciones estandard y a pH = 7 (Adaptado de J.A. Roels)

Compuesto	Molécula	"C-mol"	reacción	γ	q ($\frac{\text{k cal}}{\text{C-mol}}$)	q/γ
Metano	CH_4	CH_4	$CH_4 + 2\ O_2 \longrightarrow CO_2 + 2H_2O$	8	213.4	26.7
Etanol	C_2H_6O	$CH_3O_{0.5}$	$CH_3O_{0.5} + 3/2\ O_2 \longrightarrow CO_2 + 3/2\ H_2O$	6	163.8	27.3
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	CH_2O	$CH_2O + O_2 \longrightarrow CO_2 + H_2O$	4	111.9	28.0
Ac. Acético	$C_2H_4O_2$	CH_2O	$CH_2O + O_2 \longrightarrow CO_2 + H_2O$	4	104.8	26.2
Ac. Fórmico	$C\ H_2O_2$	CH_2O_2	$CH_2O_2 + 1/2\ O_2 \longrightarrow CO_2 + H_2O$	2	61.0	30.5
Ac. Oxálico	$C_2H_2O_4$	CHO_2	$CHO_2 + 1/4\ O_2 \longrightarrow CO_2 + 1/4\ H_2O$	1	29.4	29.4

De la tabla 4 surge que:

1) El valor de y corresponde al número de electrones que fueron transferidos desde el compuesto a oxidar, al 0_2, tomando como base 1 C-mol. Por tanto expresa el número de "electrones disponibles" por cada C-mol.

2) La cantidad de calor liberado por cada mol de electrones transferidos al oxígeno (q/y), se mantiene prácticamente constante. Del análisis de un gran número de compuestos resulta un valor promedio de

$q_o = 27.5$ k cal (mol electrones transferidos al $O_2)^{-1}$

De la conjunción de ambos puntos resulta que el valor de y es una medida de la energía contenida en un compuesto. Así, por ejemplo, 1 C-mol de etanol brinda más energía que 1 C-mol de glucosa.

En general para calcular el grado de reducción de un compuesto se plantea la ecuación de oxidación del mismo a $C0_2$ y H_2O, y el valor de y se obtiene multipli-

cando por 4 el coeficiente estequiométrico del 0_2 (ver tabla 4). Si el compuesto contiene nitrógeno, deberá especificarse cuál será el estado de oxidación final de éste. Por ejemplo, supongamos un compuesto dado por $CH_a O_b N_c$, y deseamos calcular el valor de y con respecto al nivel de referencia dado por CO_2, H_2O y NH_3.

La ecuación de oxidación será:

$$CH_aO_bN_c + nO_2 \longrightarrow g\,CO_2 + W\,H_2O + k\,NH_3$$

El valor de y será igual a 4 n. Mediante balances elementales de C, H, O y N se llega a que:

$$n = 1 + \frac{a - 3c}{4} - \frac{b}{2}$$

Por tanto y vendrá dado por:

$$\gamma = 4 + a - 2b - 3c \qquad (7)$$

La ecuación (7) es muy útil ya que permite calcular y sin necesidad de plantear la ecuación de oxidación. Debe quedar claro que tanto para el CO_2, como el H_2O y el NH_3 es $\gamma = 0$ (no tienen electrones disponibles) por ser éste el nivel de referencia elegido. Si en lugar de NH_3, hubiésemos elegido N_2, se demuestra fácilmente que para ese caso y = 4 + a - 2b. La elección del nivel de referencia es tan sólo una cuestión de conveniencia.

Con todos estos elementos estamos en condiciones de aplicar balances de materia y energía a la "reacción química" que representa al cultivo.

Para simplificar el tratamiento supondremos que la fuente de C y E no contiene nitrógeno (es lo usual) y que la fuente de nitrógeno es una sal de amonio, por lo que y estará dado por la ecuación (7).

L Balance de Carbono:

Puesto que los rendimientos están referidos a 1 C-mol de fuente de Carbono y energía, resulta

$$y_{x/s} + y_{p/s} + y_{co2/s} = 1 \qquad (8)$$

II. ***Balance de grado de reducción:***

Los electrones disponibles a la izquierda y a la derecha de la reacción deberán ser iguales, luego:

$$\gamma_s - 4b = y_{x/s}\,\gamma_x + y_{p/s}\,\gamma_p \qquad (9)$$

Debe recordarse que para el NH_3, H_2O y CO_2 es y = 0. Además el grado de reducción del 0_2 es -4.

Reordenando la ecuación (9) queda:

$$\frac{y_{x/s}\,\gamma_x}{\gamma_s} + \frac{y_{p/s}\,\gamma_p}{\gamma_s} + \frac{4b}{\gamma_s} = 1 \qquad (10)$$

o bien:

$$\eta + \xi + \varepsilon = 1 \qquad (11)$$

donde

$$\eta = \frac{y_{x/s}\ \gamma_x}{\gamma_s} \qquad (12)$$

$$\xi = \frac{y_{p/s}\ \gamma_p}{\gamma_s} \qquad (13)$$

$$\varepsilon = \frac{4b}{\gamma_s} \qquad (14)$$

η, ξ y ε representan la fracción de energía (de la fuente de carbono y energía) transferida a la biomasa, al producto y al oxígeno respectivamente. Puesto que por cada mol de electrones transferidos al 0_2 se liberan q_o = 27.5 k cal, el calor producido estará dado por:

$$q = 4\ b\ q_o \text{ (k cal / C-mol fuente de C y E)} \qquad (15)$$

De acuerdo con esto, $_e$ representa la fracción de energía disipada como calor. Mediante las ecuaciones (8) y (10) es posible analizar los resultados experimentales y verificar si las determinaciones han sido correctas. Medidas realizadas en el laboratorio deberán encontrarse dentro de los siguientes intervalos:

$$0.94 \leq y_{x/s} + y_{p/s} + y_{co2/s} \leq 1.06 \qquad (16)$$

$$0.93 \leq \eta + \xi + \varepsilon \leq 1.07 \qquad (17)$$

Cuando se tiene certeza en las determinaciones, es posible aplicar las ecuaciones para calcular algún rendimiento que no ha sido medido, por ejemplo $y_{p/s}$ en base a los demás.

Veremos seguidamente algunos ejemplos:

Ejemplo 1: Se cultivó la levadura *Candida utilis* en un medio conteniendo glucosa, $S0_4(NH_4)_2$ y sales. La concentración inicial de microorganismos fue de 0.53 g l^{-1} (X_o) y la glucosa 15.2 g l^{-1} (S_o). Al cabo de 9.5 horas, se consumió total mente la glucosa ($S_f = 0$), se consumieron 0.123 mol de 0_2 l^{-1}, se produjeron 0.179 mol de $C0_2$ l^{-1} y la biomasa alcanzó un valor de 6.07 g l^{-1} (X_f). Se desea averiguar si, además de biomasa, se formó algún producto.

Como no se dispone de datos relativos a la composición elemental de C. utilis, se supone que ésta es cercana a la del "microorganismo promedio".

$$\text{Biomasa formada} = \frac{(6.07 - 0.53)}{25.8} = 0.215 \text{ C-mol } l^{-1}$$

$$\text{Glucosa consumida} = \frac{15.2}{30} = 0.506 \text{ C-mol } l^{-1}$$

Luego: $y_{x/s} = 0.425$

Del mismo modo se tiene que $y_{co2/s} = 0.354$. Puesto que la suma de ambos rendimientos es muy inferior a 1, es evidente que se ha formado algún producto cuyo rendimiento será:

$$y_{p/s} = 1 - y_{x/s} - y_{co2/s} = 0.230$$

Para aplicar la ecuación (10) se requiere antes calcular el grado de reducción de la biomasa (y.) y de la glucosa (v_s), para lo cual se emplea la ecuación (7).

$$\gamma_x = 4 + 1.79 - 2 \times 0.5 - 3 \times 0.2 = 4.19$$

$$\gamma_s = 4 + 2 - 2 = 4$$

Además el valor de b será: b = 0.243 mol 0_2 . C - mol-1

Luego se calcula

$$\eta = \frac{y_{x/s}\ \gamma_x}{\gamma_s} = 0.445$$

$$\varepsilon = \frac{4b}{\gamma_s} = 0.243$$

Nuevamente la suma es inferior a 1 y de la ecuación (10) resulta:

$$\frac{y_{p/s}\ \gamma_p}{\gamma_s} = 1 - \eta - \varepsilon = 0.312$$

Este resultado confirma que se ha formado algún producto, pero además se puede estimar cuál es el valor de y_p.

$$\gamma_p = \frac{0.312 \cdot \gamma_s}{y_{p/s}} = 5.43$$

Tratándose de una levadura es probable que el producto formado sea etanol, cuyo v_p es 6, y si bien el valor obtenido es inferior a éste, debe tenerse en cuenta que para los cálculos se empleó la fórmula mínima del "microorganismo promedio" y no la de *Candida utilis* en particular.

Ejemplo 2: Calcular la cantidad de calor generado cuando se producen 100 g de levadura para panificación.

De acuerdo a la estequiometría vista en el Capítulo 4, por cada 100 g de levadura formada se consumen 3.1 mol 0_2. Luego el calor generado en éste caso será 3.1 x 4 x 27.5 = 342 k cal, valor muy cercano al dado por la ecuación de Harrison.

Cinética de crecimiento

Debido a la naturaleza autocatalítica del crecimiento microbiano, es lógico suponer que la concentración de microorganismos, X, influye en la velocidad con que aumenta la población, r_x Así:

$$r_x = \mu X \qquad (18)$$

En esta ecuación, p es la velocidad específica de crecimiento, la cual para un tipo de microorganismo dado depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura y pH. Existen diversas expresiones para p: la más difundida es la ecuación de Monod, que relaciona el valor de u con la concentración de un componente del medio de cultivo que está en defecto respecto de los requerimientos del microorganismo: el sustrato limitante.

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \qquad (19)$$

donde S es la concentración de sustrato limitante, u_m es la velocidad de crecimiento específica máxima, y K_s se conoce como constante de saturación. El valor de K_s está inversamente relacionado con la afinidad del microorganismo por el sustrato.

Cuando $S \gg K_s$, u toma el valor de u_m y r_x sólo depende de X.

En general K_8 tiene valore muy bajos, del orden de los mg l^{-1}, por tanto concentraciones relativamente bajas de S son suficientes para hacer que u=um. En promedio las bacterias poseen valores de um cercanos a 0.9 h^{-1}, las levaduras 0.45 h^{-1} y los hongos filamentosos 0.25 h^{-1}; de todos modos um debe ser determinado experimentalmente para cada caso en particular.

La presencia de inhibidores del crecimiento en el medio de cultivo causa disminución en el valor de p. La substancia inhibidora puede ser algún componente del medio de cultivo o algún producto formado por los microorganismos. El tipo de inhibición, al igual que en cinética enzimática, puede ser competitiva o no competitiva. Para el primer caso:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s \cdot a + S} \qquad (20)$$

mientras que para el segundo

$$\mu = \frac{\mu_m}{a} \frac{S}{K_s + S} \qquad (21)$$

donde

$$a = 1 + \frac{I}{K_I} \qquad (22)$$

siendo I la concentración de inhibidor. El valor de K_I está inversamente relacionado con la afinidad del microorganismo por el inhibidor. En la inhibición compe-

titiva, se modifica en valor de K_s. Puesto que a > 1 si existe inhibidor (ecuación (22)), resulta que la afinidad del microorganismo por el sustrato se ve disminuída. En la inhibición no competitiva, es el valor de u_m el que resulta afectado.

En ocasiones algún componente del medio de cultivo puede ser inhibidor del crecimiento, sobre todo cuando se encuentra en concentraciones relativamente elevadas. Esto es factible que ocurra con la fuente de carbono y energía por ser el componente que se encuentra en mayor proporción en los medios. Suele emplearse la siguiente expresión para considerar éste efecto:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{(K_s + S + S^2 / K_I)} \qquad (23)$$

El hecho de que una concentración de sutrata elevada pueda inhibir el crecimiento, impone una restricción a la concentración de los medios de cultivo que se pueden emplear en la práctica, y con esto a la concentración final de biomasa que se puede obtener. En el capítulo 7 se verá cómo, empleando un sistema de cultivo adecuado, es posible sortear esta dificultad.

Consumo de sustrato

Si reordenamos la ecuación (1) y derivamos respecto del tiempo se obtiene:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \qquad (24)$$

o bien:

$$r_s = \frac{1}{Y_{x/s}} r_x \qquad (25)$$

Introduciendo la ecuación (18) en la (25):

$$r_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} X \qquad (26)$$

También puede expresarse la velocidad de consumo de sustrato como:

$$r_s = q_s X \qquad (27)$$

donde q_s es la velocidad específica de consumo de sustrato. Comparando las ecuaciones (26) y (27) surge que

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} \qquad (28)$$

Si $u=u_m$ se tendrá $q_s=q_{sm}$ es decir que ambos parámetros están directamente relacionados.

Por lo expuesto hasta aquí es evidente que el crecimiento puede ser caracterizado mediante tres parámetros: K_S, u_m e $Y_{x/S}$. Estos dependen tanto del microorganismo como del medio de cultivo empleado, por lo que su evaluación debe realizarse para cada caso en particular.

Mantenimiento celular

La ecuación (25) establece que el consumo de sustrato sólo es posible cuando hay crecimiento, sin embargo cuando el sustrato considerado es la fuente de carbono y energía, puede darse el caso en que el crecimiento es nulo ($r_x = 0$) y el consumo de sustrato no. A este consumo de sustrato que no redunda en aumento de biomasa se lo asocia con el mantenimiento de funciones vitales tales como recambio de material celular, mantenimiento de gradientes de concentración y movilidad. Pirt ha propuesto la siguiente ecuación para la velocidad de consumo de la fuente de carbono y energía:

$$r_s = \frac{r_X}{Y'_{x/s}} + m_s X \qquad (29)$$

donde m_s es el coeficiente de mantenimiento e $Y'_{x/s}$ es el rendimiento que se obtendría si el mantenimiento fuese nulo. El valor de $Y_{x/s}$ es, oviamente, inferior al de $Y'_{x/s}$, la relación entre ambos se obtiene dividiendo la ecuación (29) por r_x, e introduciendo las ecuaciones (25) y (18).

$$\frac{1}{Y_{x/s}} = \frac{1}{Y'_{x/s}} + \frac{m_s}{\mu} \qquad (30)$$

De la ecuación (30) surge claramente que cuando $m_s \longrightarrow 0$; $Y_{x/s} \longrightarrow Y'_{x/s}$. Debe destacarse que $Y_{x/s}$ es el rendimiento observable, mientras que $Y'_{x/s}$ sólo puede ser evaluado indirectamente mediante la ecuación (30), aspecto que se discutirá en el capítulo 7.

Valores de m_s de 0.01 a 0.04 gg h^{-1} son frecuentes de hallar, pero se incrementan con la temperatura y con la presión osmótica del medio de cultivo. Por ejemplo para *Saccharomyces cereaisiae* creciendo en anaerobiosis se encuentra un valor de m_8=0.036 gg h^{-1}, mientras que es diez veces superior si el medio contiene una concentración de NaCl 1 M, lo cual da cuenta del trabajo osmótico que deben realizar las células. De este modo el mantenimiento celular posee una implicancia tecnológica directa, ya que un proceso destinado a la producción de biomasa debe conducirse de modo tal que el valor de m_s sea pequeño.

Requerimiento de oxígeno

En los microorganismos aerobios la obtención de energía está ligada a la presencia de oxígeno. En efecto, éste es aceptor final de los electrones provenientes de la cadena de citocromos donde se genera abundante ATP (adenosina trifosfato). Las moléculas de ATP aportarán luego la energía necesaria para las reacciones de síntesis con las que el organismo se "fabricará" a sí mismo, y la requerida para el mantenimiento celular.

Por analogía con la ecuación (29) se puede expresar la velocidad de consumo de oxígeno (r_{o2}) como:

$$r_{o2} = \frac{r_X}{Y'_{x/o}} + m_o X \qquad (31)$$

donde m_o es el coeficiente de mantenimiento en base al 0_2 e $Y'_{x/0}$ es el rendimiento, en base al 0_2 consumido, que se obtendría cuando $m_o = 0$.

Dividiendo ambos miembros de la ecuación anterior por x, se obtiene:

$$q_{o2} = \frac{\mu}{Y_{x/o}} + m_o \qquad (32)$$

donde q_{o2} es la velocidad específica de consumo de 0_2. En un cultivo en medio líquido los microorganismos utilizan substancialmente el 0_2 que está disuelto, y el valor de q_{o2} depende de cual sea esta concentración. Por analogía con la ecuación de Monod, y cuando el 0_2 es el sustrato limitante, se suele representar esta dependencia como:

$$q_{o2} = q_{o_2 m} \frac{C}{K_o + C} \qquad (33)$$

donde C es la concentración de 0_2 disuelto, K_o es la constante de saturación y $q_{o2}m$ es la velocidad específica máxima de consumo de 0_2, la cual se obtiene cuando C » Ko.

En la práctica se utiliza principalmente el concepto de concentración crítica de oxígeno disuelto, Cc, entendiéndose por tal al valor por encima del cual q_{o2} es independiente de la concentración de 0_2 disuelto y por lo tanto el crecimiento no está limitado por oxígeno. En estas condiciones el valor q_{o2} depende de cuál sea el valor se p, el cual será función del sustrato que limita el crecimiento. Si la concentración de éste es saturante, será u=u_m, yq_{o2}=q_{o2}m

Los valores de Cc para la mayoría de los organismos están en el orden de 0.1 a 1 mg l^{-1}, valores relativamente bajos si se compara con el de la solubilidad del 0_2, que a 30 °C y 0.21 atmósferas en medios acuosos diluídos es de 7.8 mg l^{-1}. Esto podría conducir al error de suponer que no constituye un problema satisfacer los requerimientos de 0_2 en los cultivos, pero el siguiente ejemplo demostrará todo lo contrario. Supongamos que tenemos una concentración celular de 10 g l^{-1} creciendo activamente en un medio de cultivo con un valor de p = 0.15 h^{-1}. Suponiendo que m_o = 2.6 mg g^{-1} h^{-1}, $Y_{x/o}$=1 g g^{-1} y que inicialmente es C = 7.8 mg l^{-1}, calcular el tiempo transcurrido hasta que la concentración de 0_2 se hace crítica e igual a 0.5 mg l^{-1}.

La velocidad de crecimiento será (ec. 18)

$$r_x = 0.15 \times 10 = 1.5 \text{ g } l^{-1} h^{-1}$$

y la de consumo de 0_2 (ec. (31))

$$r_{o2} = -\frac{dc}{dt} = \frac{1,500}{1} + 2.6 \times 10 = 1,526 \text{ mg } l^{-1} h^{-1}$$

integrando esta ecuación con la condición: a t = 0; C = 7.8 mg l^{-1} resulta

$$C = 7.8 - 1.526\,t$$

de donde el tiempo necesario para que C = 0.5 será:

$$t = \frac{7.8 - 0.5}{1{,}526} = 4.8\ 10^{-3}\ h = 17.3\ s$$

Por tanto en escasos 17 segundos el crecimiento comenzará a estar limitado por 0_2, y eventualmente llegará a detenerse cuando la concentración sea nula, a menos que sea repuesto continuamente y a una velocidad comparable a la de consumo. Este aspecto es fundamental en el diseño de biorreactores destinados a cultivos aerobios, ya que deberán ser capaces de suministrar 0_2 a altas velocidades a fin de satisfacer la demanda.

Efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento

Los microorganismos pueden crecer en una variada gama de pH que va desde pH = 2 para los acidófilos hasta pH = 11 para alcalófilos. En general los microorganismos que toleran pH ácidos no toleran pH alcalinos y viceversa. Independientemente del pH que pueda soportar un microorganismo, es importante conocer cuál es el pH óptimo para el crecimiento. En la fig. 11 está representada en forma general la variación de u_m con el pH para hongos y bacterias. De la misma surge claramente que en general los hongos tienen un pH óptimo cercano a 5 mientras que para bacterias se da alrededor de pH = 7; además debido a la forma "achatada" de las curvas, variaciones de 0.5 unidades de pH alrededor del óptimo no tienen mayor influencia. Durante el crecimiento los microorganismos modifican el pH del medio de cultivo, normalmente haciéndolo disminuir; por tal motivo es frecuente incluir en el medio substancias que actúen como tampon (buffer) a fin de evitar que el pH se aleje del óptimo.

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento es complejo. Por un lado cada reacción química individual, de todas las que conforman el metabolismo, es afectada por la temperatura, por lo que un incremento de ésta resulta en una mayor velocidad de reacción. Esto se traduce en un aumento de pm con la tempe-

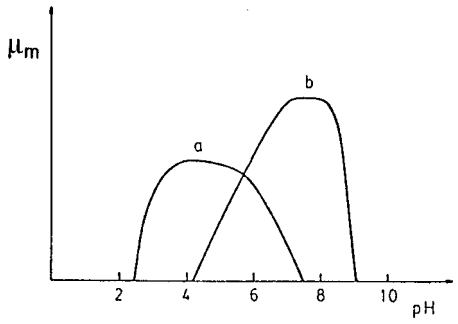


Figura 11. Efecto del pH sobre μm. Curva a: hongos. Curva b: bacterias.

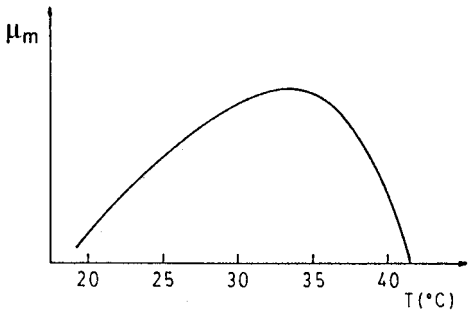


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre μ_m para un microorganismo mesófilo.

ratura (ver Fig. 12). Por otra parte, aumentos posteriores de temperatura inactivan las enzimas que catalizan las reacciones, con lo que el valor de um decrece rápidamente. La temperatura óptima resulta de la interacción de estos dos efectos. Como regla general, los microorganismos psicrofilos poseen temperatura óptima entre 10 y 20 °C, los mesófilos entre 30 y 40 °C y, finalmente, los termófilos entre 50 y 60 °C. La necesidad de mantener la temperatura de cultivo en el valor óptimo, hace que los biorreactores (fermentadores) cuenten con dispositivos apropiados para tal fin.

Lecturas recomendadas:

1. *Energetics and kinetics in Biotechnology*. J.A.Roels. Elsevier Biomedical Press, 1983.
2. *Fermentation kinetics and modeling. C.G.* Sinclair and B. Kristiansen Ed.: J.D. Bu'Lock. Open University Press, 1987.
3. *Principles of Microbe and Cell Cultivation.* S.J.Pirt. Blackwel l Scientific Publications, 1975.

Capítulo 6

FORMACIÓN DE PRODUCTOS

La diversidad de productos formados por los distintos tipos de microorganismos es sumamente amplia, desde moléculas muy simples como el etanol hasta las muy complejas como pueden serlo una enzima o un antígeno. Formalmente se puede entonces clasificar los productos como:

1. Productos de bajo peso molecular.
   Estos incluyen a alcoholes, ácidos carboxílicos, aminoácidos, nucleótidos, antibióticos, etc.
2. Productos de alto peso molecular.
   Los que a su vez pueden dividirse en:
   2.1. Componentes estructurales:
   Polisacáridos, proteínas, antígenos, etc.
   2.2. Enzimas:
   Pudiendo ser éstas intra o extracelulares.

La industria química "compite con los microorganismos" tan sólo en la obtención de algunos productos de bajo peso molecular como por ejemplo el etanol o el butanol, siendo los demás de dominio exclusivo de los microorganismos y, por otra parte, la única fuente disponible para el hombre.

Cualquiera sea el producto que se desee obtener, son varios los aspectos que deben considerarse. Estos según Pirt, pueden resumirse como:

I. Selección de una cepa microbiana apropiada.

II. Determinación de los valores óptimos de temperatura, pH, presión osmótica. En procesos aerobios, además, es de fundamental importancia conocer el requerimiento de oxígeno a fin de poder satisfacerlo (ver capítulo 7).

III. Determinación y optimización de los requerimientos nutricionales y de la concentración de biomasa.

IV. Modificación del genoma tendiente a incrementar la formación del producto deseado.

En el capítulo anterior se vio que la formación de biomasa y de producto son procesos contrapuestos, lo cual, si bien es cierto, podría conducir al error de suponer que el único objetivo en la formación de un producto es maximizar $Y_{p/s}$. Por otra parte el producto es una consecuencia de la actividad de los microorganismos; luego la presencia de éstos también es importante.

Este concepto puede resumirse del siguiente modo: si q_p es la velocidad específica de formación de producto podemos poner:

$$\frac{dP}{dt} = q_p X \qquad (1)$$

al cabo de un tiempo, t, y suponiendo que inicialmente P = 0 será:

$$P = \int_0^t q_p X \, dt \qquad (2)$$

La ec. (2) indica que tanto la concentración celular como la capacidad biosintética de la misma (q_p) son importantes en la obtención de un producto. El concepto que resume ambos aspectos el es de productividad, esto es la cantidad de producto obtenido dividido el tiempo necesario para obtenerlo, la que puede ser mejorada entonces aumentando X, q_p o ambos. Puede ocurrir que un aumento de X cause disminución de q_p, siendo necesario en tal caso encontrar una solución de compromiso; es decir una combinación que haga máxima la productividad.

La clasificación dada al comienzo de este capítulo, no pasa de ser una mera enunciación de todos los productos que se pueden obtener de los microorganismos. Es más útil, al menos para los productos de bajo peso molecular, clasificar los según que función cumplan dentro del metabolismo. Se pueden distinguir así tres grupos:

I. Productos finales del metabolismo energético.

II. Productos intermedios de metabolismo primario.

III. Productos de metabolismo secundario.

I. Son ejemplos de este grupo el etanol, ácido láctico, acético, butírico, butanol, y otros compuestos asociados a procesos anaerobios. Su formación es consecuencia directa de la degradación de la fuente de carbono para obtener energía. Hemos visto en el capítulo anterior que la energía se emplea tanto para crecimiento como para mantenimiento celular, por lo que en este tipo de productos la velocidad de formación tendrá dos contribuciones:

$$r_p = \frac{r_x}{Y'_{x/p}} + \beta X \qquad (3)$$

o bien:

$$q_p = \frac{\mu}{Y'_{x/p}} + \beta \qquad (4)$$

El primer término del segundo miembro expresa la velocidad de formación de producto debida al crecimiento, y el segundo la debida al mantenimiento. La estrategia para la obtención de estos productos consiste en contar con una concentración celular elevada sometida a condiciones tales que el mantenimiento sea grande, lo cual puede lograrse, como hemos visto, aumentando la tonicidad del medio y también modificando la temperatura. Existe otra alternativa que consiste en limitar el cultivo en nitrógeno de modo tal que las células se vean impedidas de duplicarse al no poder sintetizar más componentes estructurales, y la fuente de carbono se derive, principalmente vía mantenimiento, hacia la formación de producto. Por ejemplo la obtención del etanol por levadura puede dividirse en dos etapas: en la primera el proceso es aerobio y el medio de cultivo contiene una relación de fuente de carbono a fuente de nitrógeno apropiada para obtener un buen crecimiento. La segunda etapa se realiza en condiciones anaerobias y en un medio con escasa concentración de fuente de nitrógeno y elevada concentración de fuente de carbono, la cual es convertida prácticamente en un 90% en etanol y $C0_2$. En este caso la tolerancia de la levadura al etanol es un aspecto importante a considerar.

II. Pertenecen a este grupo los aminoácidos, los nucleótidos, las vitaminas, los ácidos orgánicos, y pueden incluirse también biopolímeros como enzimas.

Los procesos de obtención son aerobios y la formación de estos productos ocurre principalmente en organismos que han sido sometidos a mutaciones o que se los hace crecer en medios deficientes. En cualquier caso lo que se pretende es lograr una regulación anormal del metabolismo tal que la fuente de carbono y energía se derive hacia la formación del producto deseado. Por ejemplo, para la obtención de lisina se emplean cepas de *Corynebacteriuin glutamicum* que carecen de la enzima Homoserina deshidrogenasa, de este modo resulta ser auxotrofo para metionina y treonina (ver fig. 13). Además la enzima deshidroxipicolinato sintetasa no es inhibida por lisina. Esta conjuntamente con la treonina ejercen inhibición concentrada sobe la Aspartatoquinasa de modo tal que aún en este mutante no se acumulará lisina si en el medio de cultivo hay treonina libre.

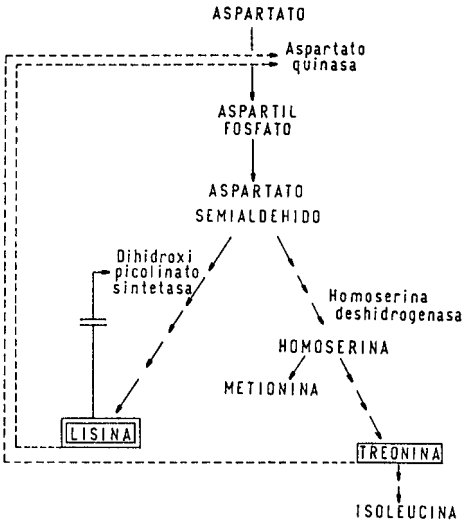


Figura 13. Regulación de la síntesis de lisina en *Corynebacterium glutamicum*.

La estrategia para obtener lisina consiste en realizar el cultivo en condiciones tales que la concentración de treonina libre sea mínima, lo cual se consigue alimentando el cultivo con este aminoácido y tratando de mantener su concentración en valores muy pequeños. Así se evita la inhibición concertada, con lo cual la lisina, al no ejercer retroinhibición sobre la dihidroxipicolinato sintetasa, se acumula en el medio de cultivo.

El ejemplo visto es demostrativo de la importancia que tiene el conocimiento del metabolismo y su regulación en el momento de seleccionar los mutantes apropiados, como así también la elección de una técnica de cultivo adecuada en el momento de la producción.

En general, y a diferencia de los productos pertenecientes al primer grupo, no existe una relación directa entre la generación de energía y la síntesis de los productos de este grupo. Volviendo al ejemplo de la lisina, por cada mol formado se forman cuatro de NADH y se consume uno de ATP, por lo que la formación de lisina está asociada en una formación neta de ATP si se tiene en cuenta el poder reductor acumulado.

La cinética de formación de estos productos es más compleja que los del grupo 1, y no existe hasta el momento ninguna expresión simple que abarque a todos, si bien Roels y Kossen han propuesto la siguiente ecuación para ser ensayada con este tipo de productos.

$$\frac{q_p}{q_p max} = \frac{\mu}{\mu_m} \cdot \frac{\varepsilon}{1 + (\varepsilon - 1)(\mu/\mu_m)} \qquad (5)$$

La misma posee gran flexibilidad ya que E puede tomar cualquier valor mayor que cero, lo que permite ajustar distintas relaciones entre q_p y u. Por ejemplo si E = 1, la relación entre q_p y p es directa; si E = 100 se tiene que q_p alcanza valores cercanos al máximo aún a valores pequeños de u/u_m. En general, y cualquiera sea el producto, se trata siempre de encontrar que tipo de relación existe entre q_p y u, ya que éste es uno de los factores a tener en cuenta en el momento de planear la estrategia dé producción.

III. Pertenecen a este grupo los antibióticos, las toxinas, los alcaloides y las giberelinas. Históricamente se ha considerado a los metabolitos secundarios como aquellos que no son indispensables para las funciones vitales del microorganismo, a diferencia de los metabolitos primarios, aunque tal afirmación se encuentre actualmente en revisión. Cualquiera sea el caso, existen algunas características que diferencian a este grupo del anterior.

Frecuentemente los precursores específicos para la biosíntesis de estos productos son obtenidos por modificación de metabolitos primarios. Así muchos antibióticos contienen en su molécula aminoácidos infrecuentes como D-aminoácidos, N-metil aminoácidos, B-aminoácidos o iminoácidos; o azucares modificados, bajo la forma de dimetil aminoazúcares.

Por otra parte estos precursores suelen ser limitantes de la biosíntesis. Por ejemplo la adición al medio de cultivo de ácido fenil acético estimula la producción de Bencil penicilina, los ácidos a-aminobutírico y a,y-diaminobutírico son limitantes de la biosíntesis de colistina. En estos casos la supresión de los mecanismos de regulación de la síntesis de los precursores puede resultar en un incremento en la producción.

Otra característica interesante es que algunas enzimas del metabolismo secundario no posee alta especificidad por el sustrato. Un ejemplo bien conocido es el de la penicilina aciltransferasa del *Penicillican chrysogenum*, que cataliza el intercambio del resto a-aminoadipil de la penicilina N (amino adipil penicilina), por restos acídicos hidrofóbicos (ver Fig. 14). La enzima es específica para uno de los sustratos, el ácido 6-amino-penicilánico, mientras que es relativamente inespecífica para el precursor de la cadena lateral, el cual debe poseer el grupo $-CH_2$ - COOH terminal para ser incorporado.

Finalmente, y ya en relación a la producción, la mayoría de los productos de este grupo comparten la propiedad de formarse cuando los microorganismos crecen a bajos valores de u. Se cree que una de las causas sería el fenómeno conocido como represión catabólica ya comentado, por el cual estaría reprimida la biosíntesis de las enzimas asociadas al metabolismo secundario cuando el crecimiento ocurre a valores de u altos, mientras que se desreprimiría a valores de u bajos.

Durante años, se utilizó lactosa como fuente carbonada para la obtención de penicilina porque daba mejores rendimientos que la glucosa. La diferencia radicaba en que la lactosa era metabolizada lentamente por el hongo, y la glucosa rápidamente. En la actualidad se emplea esta última como fuente carbonada, pero suministrándola lentamente al cultivo a fin de regular u a valores compatibles con la síntesis de penicilina.

El cultivo continuo y el bath alimentado, ya mencionados en el capítulo 2 y que se estudiarán en el capítulo 7, son sistemas de cultivo que permiten regular la velocidad de crecimiento, y por tanto muy apropiados para obtener este tipo de productos.

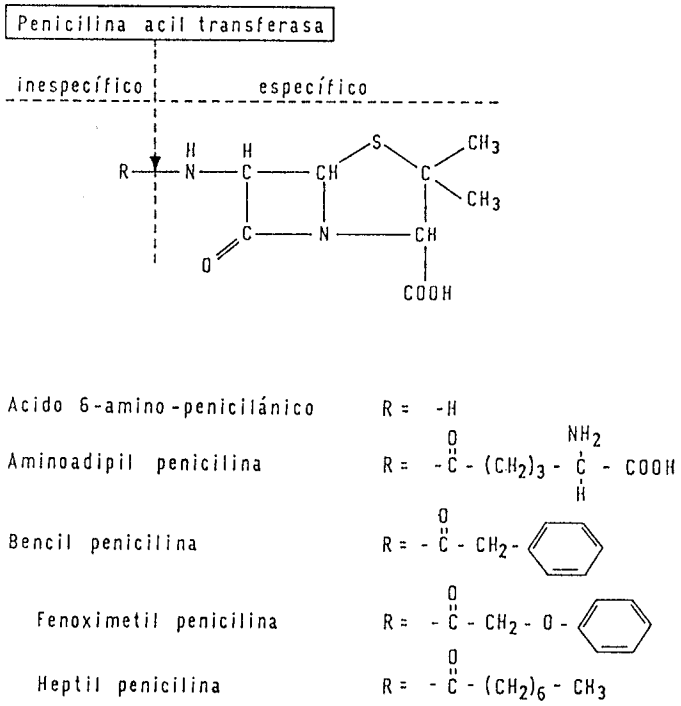


Figura 14. Distintas penicilinas que pueden obtenerse en función del precursor de la cadena lateral.

Los productos de este grupo comparten con el anterior la necesidad de un adecuado suministro de oxígeno para su formación. Cuando este requisito no es satisfecho los rendimientos disminuyen.

Lecturas recomendadas:

1. *Primary Products of Metabolism*. Ed. A.H. Rose. Academi Press, 1978.
2. *Secondary Products of Metabolism*. Ed. A.H. Rose. Academic Press, 1979.
3. *Biotechnology Vol. 1. Microbial Fundamentals.* Ed. H.J.Reh m and G. Reed. Verlagh-Chemie, 1981.
4. *Comprehensive Biotechnology, Vol. 1.* The Principles of Biotechnology: *Scientific Fundamentals*. Ed. Murray Moo-Young, Alan T. Bull, Howard Dalton. Pergamon Press 1985.
5. *Principles of Microbe and Cell Cultivation.* S.J.Pirt. Blackwell Scientific Publications, 1975.
6. *Principios de Microbiologia Indultrial.* A. Rhodes y D.L.Fletcher. Editorial Acribia, 1969.

Capítulo 7

SISTEMAS DE CULTIVO Y ASPECTOS GENERALES DE BIORREACTORES

Como ya se dijo, el equipo donde se realiza el proceso se denomina biorreactor o fermentados.

El mismo provee todos los servicios que son necesarios para el cultivo, tales como mezclado, termostatización, suministro de oxígeno, entradas para adición de nutrientes, control del pH, etc. Por otra parte, cuando se habla de sistemas de cultivo o, también, métodos de cultivo, se hace referencia al modo de operar el biorreactor, esto es en forma continua o discontinua.

En la primer parte de este capítulo estudiaremos los sistemas de cultivo y dejaremos para la segunda los biorreactores.

Sistemas de cultivo

Para un componente cualquiera del cultivo, incluida la biomasa, se puede plantear el siguiente balance de materia en el biorreactor (ver Fig. 15).

Velocidad de acumulación = velocidad de ingreso - velocidad de salida + velocidad de formación − velocidad de consumo

$$\frac{d(V C_i)}{dt} = F_1 C_{i1} - F_2 C_i + V r_{fi} - V r_{ci} \qquad (1)$$

donde V es el volumen de cultivo, F_1 es caudal de alimentación, F_2 el de salida, C_{i1} la concentración del componente "i" en la alimentación y C_i la concentración en el caudal de salida, la que, si el cultivo esta bien mezclado, se puede asumir idéntica a la que hay dentro del biorreactor. Los restantes términos, r_{fi} y r_{ci} se refieren a la velocidad de formación y consumo del componente "i" respectivamente.

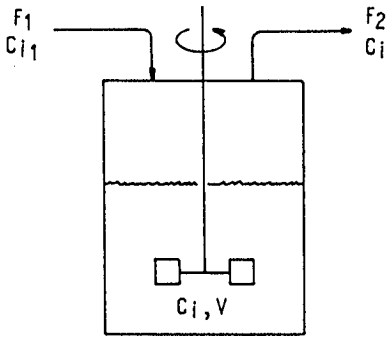


Figura 15. Esquema de un biorreactor con indicación de los caudales y concentraciones a la entrada y a la salida. La flecha que rodea el eje del agitador significa que el cultivo está perfectamente mezclado.

Por otra parte el volumen de cultivo variará en el tiempo según sean F_1 y F_2.

Suponiendo que la densidad del cultivo y de la alimentación son iguales resulta:

$$\frac{dV}{dt} = F1 - F2 \qquad (2)$$

Ahora bien, dependiendo de como sean F_1 y F_2 surgen, básicamente, tres sistemas de cultivo:

1. Cultivo continuo

Ambos caudales son iguales y por la ec. (2) es V constante, por lo tanto la ec. (1) se reduce a:

$$V \cdot \frac{dC_i}{dt} = F(C_{i1} - C_i) + V(r_{fi} - r_{ci}) \quad (3)$$

2. Batch alimentado

El caudal de salida, F_2, es nulo, por lo que V aumentará en el tiempo en función del caudal de entrada.

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (4)$$

y en el balance de materia se anula el término $F_2 C_i$ resultando:

$$\frac{d(V C_i)}{dt} = F C_{i1} + V(r_{fi} - r_{ci}) \quad (5)$$

Debe destacarse que en este caso V permanece dentro del operador diferencial pues varia con el tiempo según la ec. (4). Por tal motivo el batch alimentado, y a diferencia del caso anterior, tiene duración limitada en el tiempo ya que el volumen no puede incrementarse más allá del volumen útil que posee el biorreactor.

3. Batch

Ambos caudales son nulos por lo que V es constante y en la ec. (1) se anulan los términos $F_1 C_{i1}$, $F_2 C_i$.

$$\frac{dC_i}{dt} = r_{fi} - r_{ci} \quad (6)$$

La duración del cultivo batch es, por supuesto, también limitada en el tiempo y depende esencialmente de las condiciones iniciales del cultivo. Una vez inoculado el medio, la concentración de biomasa aumenta a expensas de los nutrientes y cuando el sustrato que limita el crecimiento se agota, finaliza el batch.

Analizaremos ahora con más detalle cada uno de los sistemas vistos aplicando en particular los balances de materia a la biomasa, X, al producto, P, y al sustrato limitante de crecimiento, S. Para los dos primeros sólo es necesario considerar la cinética de formación r_X y r_p respectivamente, con lo cual $r_{ci} = 0$ en ambos casos. Para el sustrato se tiene el caso inverso y sólo deberá considerarse la velocidad de consumo, r_s. Si por las características del proceso, la lisis celular o la descomposición del producto son importantes, deberá incluirse en el balance un término adicional que contemple este aspecto.

Cultivo continuo

Para poner en marcha un cultivo continuo, se realiza previamente un cultivo batch y en un momento dado se comienza a alimentar con medio fresco a un caudal F y por un rebalse se mantiene el volumen constante.

El caudal de salida contendrá células, medio de cultivo parcialmente agotado

y, eventualmente, algún producto. Si alimentamos con medio fresco significa que $X_1 = 0$ y $P_1 = 0$, por lo que sólo deberemos considerar la concentración de sustrato limitante del crecimiento, S_1, en la alimentación. En base a estas consideraciones los balances de materia para X, S y P serán (ver ec. (3)):

$$V \cdot \frac{dX}{dt} = -FX + V r_x \qquad (7)$$

$$V \cdot \frac{dS}{dt} = F(S_1 - S) - V r_s \qquad (8)$$

$$V \cdot \frac{dP}{dt} = -FP + V r_p \qquad (9)$$

En estado estacionario las concentraciones dentro del biorreactor permanecerán constantes en el tiempo, lo que significa igualar a cero las ecuaciones (7), (8) y (9). De la primera, y teniendo en cuenta que $r_X = ux$, resulta:

$$\frac{F}{V} = D = \mu \qquad (10)$$

donde D es la velocidad de dilución. Si se reemplaza u por la ec. (19) del capítulo 5 resulta que la concentración de S en estado estacionario es

$$\bar{S} = \frac{K_s D}{\mu_m - D} \qquad (11)$$

donde $\bar{S}$ representa la concentración en estado estacionario. De la ec. (8) surge:

$$r_s = D(S_1 - \bar{S}) \qquad (12)$$

Por la ecuación (26) del capítulo 5 es

$$r_s = \frac{\mu X}{Y_{x/s}}$$

además u = D, por lo tanto la concentración de biomasa en estado estacionario es:

$$\bar{X} = Y_{x/s}(S_1 - \bar{S}) \qquad (13)$$

Si en particular S es la fuente de carbono y energía, r_s vendrá dado por la ecuación (29) del capítulo 5 y X será:

$$X = \frac{D Y'_{x/s} (S_1 - \bar{S})}{(D + m_s Y'_{x/s})} \qquad (14)$$

Cuando $m_s = 0$, la ecuación (14) se reduce a la ecuación (13).

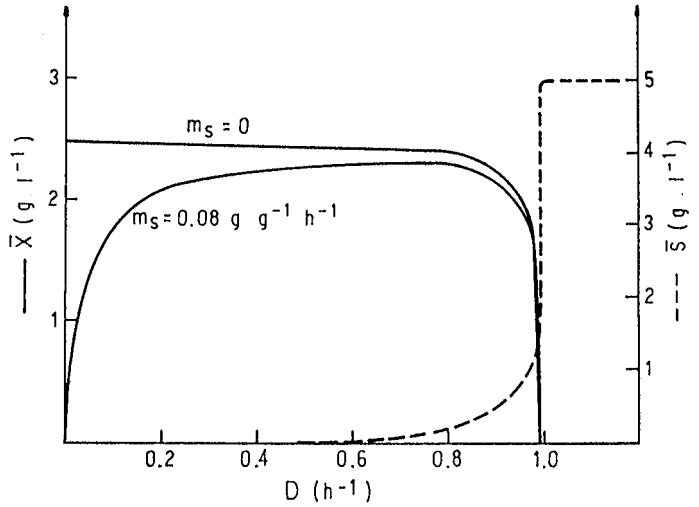


Figura 16. Cultivo continuo. Concentración de biomasa y de sustrato limitante en estado estacionario a distintos valores de D. Parámetros: $\mu_m = 1\ h^{-1}$; $Y'_{x/s} = 0.5$; K_s 0.05 g l^{-1}; $S_1 = 5\ g\ l^{-1}$.

La Fig. 16 muestra como varían la concentración de sustrato en estado estacionario en función de la velocidad de dilución. La curva superior corresponde a la ecuación (13) y la inferior a la ecuación (14), pudiéndose observar en este último caso que el efecto del mantenimiento celular se hace notable a bajas velocidades de dilución. En ambos casos puede apreciarse que existe un valor de D por encima del cual es $\bar{X} = 0$, con lo cual por la ecuación (13) o (14) es $S = S_1$. Si se reemplaza este valor en la ecuación (11) se obtiene la velocidad de dilución crítica D_c.

$$D_c = \mu_m \frac{S_1}{K_s + S_1} \qquad (15)$$

Si como ocurre normalmente $S_1 \gg K_s$ se tiene que $D_c = u_m$, lo cual es un criterio muy útil en el momento de seleccionar un valor de D apropiado, ya que deberá cumplirse que $D < u_m$. En caso contrario ocurrirá el "lavado" del cultivo, debido a que la velocidad de salida de las células del biorreactor será mayor que la de crecimiento.

Debe tenerse en cuenta que la Fig. 16 se representa en caso que pl está dado por la ecuación de Monod, pero si en medio del cultivo hay sustancias inhibidoras del crecimiento (o son formados por microorganismos) o el sustrato limitante es el inhibidor, deberán emplearse las expresiones de u correspondientes dadas en el capítulo 5.

Formación de producto:

En estado estacionario, la ecuación (9) se reduce a:

$$\bar{P} = \frac{r_p}{D} \qquad (16)$$

o bien

$$\bar{P} = \frac{q_p \bar{X}}{D} \qquad (17)$$

donde P representa la concentración de producto en estado estacionario. Dependiendo de como sea la cinética de formación del producto será la forma de la curva P vs. D. Alternativamente puede emplearse, y de hecho se emplea, el cultivo continuo para elucidar qué tipo de relación existe entre q_p y u, ya que como se mencionó en el capítulo 6, es uno de los factores a tener en cuenta para planear la estrategia de producción, como se verá más adelante cuando se trate la producción de penicilina.

Determinación de los parámetros de crecimiento:

El cultivo continuo es sumamente útil para determinar parámetros de crecimiento tales como K_s, u_m o $Y'_{x/s}$. Así reordenando la ecuación (11) se obtiene

$$\frac{1}{D} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \cdot \frac{1}{\bar{S}} \qquad (18)$$

Graficando 1/D en función de $1/\bar{S}$, los puntos deberán ajustarse a una recta cuya intersección con el eje 1/D dará el valor de $1/u_m$ y la pendiente K_s/u_m; si es que el cultivo puede ser representado por una cinética como la de Monod.

Por otra parte redondeando la ecuación (14) resulta:

$$D \frac{(S_1 - \bar{S})}{\bar{X}} = \frac{D}{Y'_{x/s}} + m_s \qquad (19)$$

de donde la gráfica de $D(S_1-S)/X$ en función de D permitirá estimar $1/Y'_{x/s}$ y m_s. Obviamente en este caso el sustrato considerado es la fuente de carbono y energía.

Batch. alimentado

Para iniciar un batch alimentado valen las mismas consideraciones que se hicieron para iniciar un cultivo continuo, salvo que en este caso supondremos que se inicia la alimentación del cultivo cuando el sustrato limitante se ha agotado. Si bien éste no es un requisito indispensable, permite simplificar el tratamiento matemático y además es un buen punto de partida con respecto al objetivo del batch alimentado, es decir: controlar la velocidad de crecimiento mediante la velocidad de alimentación. También supondremos que alimentamos con medio de cultivo fresco, es decir que $X_1 = 0$ y $P_1 = 0$. Luego los balances de materia para X, S y P serán (ec. (5)):

$$\frac{d(XV)}{dt} = V r_x = V \mu X \qquad (20)$$

$$\frac{d(SV)}{dt} = F S_1 - V r_s \qquad (21)$$

$$\frac{d(PV)}{dt} = V r_p \qquad (22)$$

A fin de no extender innecesariamente el tratamiento matemático discutiremos solamente la formación de biomasa y el consumo de sustrato. De todos modos, si r_p es conocida el procedimiento no varía mayormente.

Si en la ecuación (21) se reemplaza r_s por $r_x / Y_{x/s}$ y se tiene en cuenta la ecuación (20) resulta

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_1 - \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{d(XV)}{dt} \qquad (23)$$

Si deseamos que la velocidad de crecimiento esté controlada por la de alimentación, ésta deberá ser tal que en todo momento sea S =0 y por lo tanto d(SV) / dt = 0. Esto equivale a decir que el sustrato es consumido totalmente ni bien ingresa al biorreactor. Luego:

$$\frac{d(XV)}{dt} = Y_{x/s} F S_1 \qquad (24)$$

e integrando

$$XV = X_0 V_0 + Y_{x/s} F S_1 t \qquad (25)$$

donde X_o y V_o representan la concentración de biomasa y el volumen de cultivo en el momento de iniciar la alimentación. La variación de V con el tiempo se obtiene integrando la ec. (4).

$$V = V_0 + F t \qquad (26)$$

El criterio para diseñar una alimentación adecuada se obtiene combinando las ecuaciones (20) y (24), de donde at = 0, resulta

$$F S_1 = \frac{V_0 \mu X_0}{Y_{x/s}} \qquad (27)$$

En la ec. (27) se puede emplear cualquier valor de u hasta u_m, por tanto la ec. (27) puede reescribirse como:

$$F S_1 \leq \frac{V_0 \mu_m X_0}{Y_{x/s}} \qquad (28)$$

Como criterio adicional conviene seleccionar el valor de S_1 tan alto como sea posible y F relativamente pequeño a fin de evitar la excesiva dilución del cultivo. La contrapartida es que la duración del batch alimentado puede prolongarse excesivamente, por lo que normalmente se trata de encontrar la solución de compromiso, donde intervienen además, aspectos económicos.

El valor de u durante el batch varía permanentemente, ya que por la ecuación (20) es:

$$\mu = \frac{1}{XV} \quad \frac{d(XV)}{dt} \tag{29}$$

reemplazando en la ecuación (29) las ecuaciones (24) y (25) resulta

$$\mu = \frac{Y_{x/s} F S_1}{X_0 V_0 + Y_{x/s} F S_1 t} \tag{30}$$

Por tanto u disminuye con el tiempo. Esto es válido solamente para el caso tratado aquí, es decir con F y S_1 constantes, pero nada impide hacer alimentaciones con F = F(t) o $S_1 = S_1(t)$, con lo cual puede lograrse, por ejemplo, que u se mantenga constante o bien que aumente hasta valores cercanos a u_m La diversidad de alimentaciones posibles que pueden emplearse es, quizás, una de las características más apreciables de batch alimentado. La otra es que este sistema de cultivo es muy apropiado para obtener altas concentraciones de biomasa, muy superiores a las que se podrían obtener en un batch, donde la limitación está dada por la concentración inicial de nutrientes del medio de cultivo que pueden tolerar los microorganismos.

Si se considera el mantenimiento celular el valor de r_s para la fuente de carbono y energía vendrá dado por la ecuación (29) del capítulo 5, y mediante un proceso similar al descripto resulta:

$$\frac{d(XV)}{dt} + Y'_{x/s} m_s XV = F S_1 Y'_{x/s} \tag{31}$$

Resolviendo la ecuación diferencial se obtiene:

$$XV = \frac{F S_1}{m_s} + \left(X_0 V_0 - \frac{F S_1}{m_s} \right) e^{-m_s Y'_{x/s} t} \tag{32}$$

También se demuestra fácilmente que en este caso el criterio para calcular la alimentación está dado por:

$$F S_1 \leq \frac{V_0 \mu_m X_0}{Y'_{x/s}} + m_s X_0 V_0 \tag{33}$$

En la Figura 17 se representa la ecuación (32) para distintos valores de m_s, y la ecuación (25) que corresponde al caso en que $m_s = 0$. Se observa claramente que cuanto mayor es m_s menor es la cantidad de biomasa obtenida, además las curvas con m_s distinto de 0 tienden asintóticamente a un valor máximo que está dado por:

$$(XV)_{max} = \frac{F S_1}{m_s} \tag{34}$$

Este valor se obtiene directamente de la ecuación (31) haciendo d (XV) / dt = 0. En estas condiciones la totalidad de la fuente de carbono y energía que ingresa

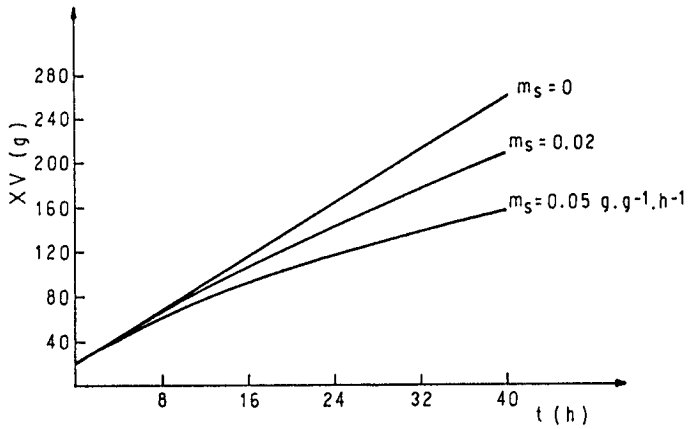


Figura 17. Batch alimentado con alimentación constante. Parámetros: $F = 0.05\ l\ h^{-1}$; $S_1 = 240\ g\ l^{-1}$; $Y'_{x/s} = 0.5$; $X_0 = 10\ g\ l^{-1}$; $V_0 = 2\ l$. El volumen final es 4 l.

gresa al biorreactor se utiliza para mantenimiento celular y por lo tanto ya no es posible aumentar la cantidad de biomasa. Alternativamente, si el cultivo se realiza con el objeto de obtener un producto perteneciente al grupo I (asociado al metabolismo energético), convendrá trabajar siempre en las condiciones indicadas, ya que toda la fuente de carbono suministrada se transformará en el producto deseado.

Batch

Aplicando la ecuación (6) a la biomasa, al producto y al sustrato resulta:

$$\frac{dX}{dt} = r_x = \mu X \tag{35}$$

$$\frac{dS}{dt} = r_s = \frac{\mu X}{Y_{x/s}} \tag{36}$$

$$\frac{dX}{dt} = r_p \tag{37}$$

Suponiendo que no se forma producto y que la relación u - S puede ser representada por la ecuación de Monod surge que:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{XS}{K_s + S} \tag{38}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \cdot \frac{XS}{K_s + S} \tag{39}$$

El sistema formado por las ecuaciones (38) y (39) posee solución analítica, pero en ésta no aparece X en forma explícita por lo que resulta de escasa utilidad.

En cambio es posible analizar casos particulares haciendo algunas suposiciones.

Por ejemplo se puede asumir que durante una buena parte del tiempo se cumplirá que $S \gg K_s$, por lo tanto las ecuaciones (38) y (39) se reducen a:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \qquad (40)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_m X}{Y_{x/s}} \qquad (41)$$

Por tanto bajo las condiciones indicadas el crecimiento se llevará a cabo con el máximo valor de p posible. Integrando la ecuación (40) con la condición a t = 0; $X = X_0$, se llega a la expresión:

$$X = X_0 e^{\mu_m t} \qquad (42)$$

o bien:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m t \qquad (43)$$

La ecuación (42) establece que para $S \gg K_s$ el crecimiento es exponencial (fase exponencial), y por la ecuación (43) es posible calcular el valor de u_m graficando el lnX en función del tiempo.

La variación de S con t se obtiene introduciendo la ecuación (42) en la ecuación (41) e integrando con la condición:

$$a\ t = 0;\ S = S_0$$

$$S = S_0 - \frac{X_0}{Y_{x/s}} (e^{\mu_m t} - 1) \qquad (44)$$

A medida que el cultivo transcurre, S disminuye hasta que se llega a la condición en que S es comparable a K_s y por lo tanto dX/dt comienza a disminuir (fase de desaceleración) hasta hacerse finalmente nula cuando S = 0. En este punto se alcanza la máxima concentración de biomasa y finaliza el batch (fase estacionaria). La concentración final de biomasa, X_f se puede calcular si se conoce el $Y_{x/s}$:

$$Y_{x/s} = -\frac{(X_f - X_0)}{(S_f - S_0)} \qquad (45)$$

puesto que $S_f = 0$ resulta:

$$X_f = X_0 + Y_{x/s} S_o \quad (46)$$

Alternativamente se pueden emplear las ecuaciones (45) o (46) para calcular el $Y_{x/s}$.

En la Fig. 18 se representan las distintas fases de crecimiento hasta aquí descriptas, que surgen de suponer válida a la ecuación de Monod. Sin embargo antes de la fase exponencial suele existir otra fase (I) conocida como fase de retardo, durante la cual la concentración de biomasa no se modifica substancialmente, pero ocurren profundos cambios en la composición macromolecular y en el "estado fisiológico" de las células, ambos tendientes a adaptarlas al nuevo entorno.

Si se considera esta fase, debe aplicarse una corrección a la ecuación (43), lo que esencialmente consiste en restarle al tiempo real el tiempo transcurrido hasta que efectivamente comienza el crecimiento

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m (t - t_r) \quad (47)$$

donde t,. da cuenta de la duración de la fase de retardo.

Normalmente esta fase no es deseable ya que significa una pérdida de tiempo, por lo que usualmente se trata de minimizarla. Una forma de lograrlo consiste en hacer crecer el inóculo en un medio de cultivo igual al que se va a emplear posteriormente, y además transferirlo cuando las células se encuentran en plena fase exponencial.

Por otra parte después de la fase estacionaria sobreviene la fase de declinación (V) que consiste en una disminución de la concentración de biomasa debida a la lisis celular. Esta fase puede representarse considerando una cinética adicional en el balance de materia, aspecto que ya fue discutido.

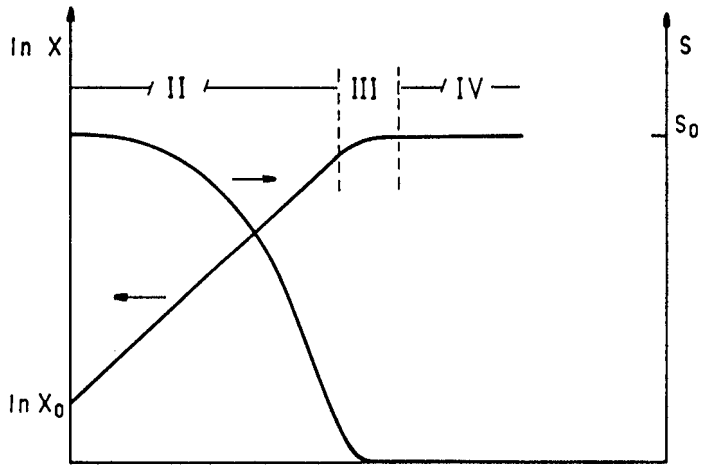


Figura 18. Batch. Curva de crecimiento y consumo de sustrato. II = fase exponencial; III = fase de desaceleración; IV = fase estacionaria.

El cultivo tipo "batch", si bien es quizás el más difundido, es el que menos posibilidades de control ofrece. Una vez sembrado el medio de cultivo y fijada la temperatura, las células quedan "libradas a su propia suerte" o, dicho de otro modo, a su propia potencialidad, que se manifiesta creciendo a la máxima velocidad que le permite el medio de cultivo empleado, siendo el operador un mero espectador de los acontecimientos. En este aspecto tanto el cultivo continuo como el "batch" alimentado superan ampliamente al "batch".

Biorreactores

El biorreactor, es sin duda, uno de los equipos fundamentales de la microbiología industrial. Es el recipiente donde se realiza el cultivo, y su diseño debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos.

Las "tareas" que realiza el biorreactor pueden resumirse del siguiente modo:

a) Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación.

b) Mantener constante y homogénea la temperatura.

c) Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.

d) Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo (ver cap. 5)

e) El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente sembrado con el microorganismo deseado.

Para satisfacer los cuatro primeros puntos es necesario que el biorreactor esté provisto de un sistema de agitación, a demás para el punto d) se requiere de un sistema que inyecte aire en el cultivo.

Describiremos brevemente dos tipos de biorreactores de uso muy difundido: el tanque agitado y al "air lift". En el primero de ellos (Figura 19) la agitación se realiza mecánicamente mediante un eje provisto de turbinas accionado por un motor.

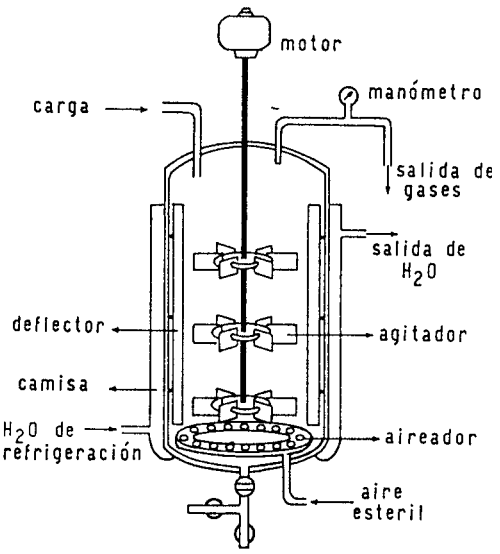


Figura 19. Tanque agitado. El mezclado se realiza mecánicamente.

El aire se inyecta por la parte inferior del tanque y es distribuido por una corona que posee pequeños orificios espaciados regularmente. El chorro de aire que sale de cada orificio es "golpeado" por las paletas de la turbina inferior generándose de este modo miles de pequeñas burbujas de aire, desde las cuales difunde el O_2 hacia el seno del líquido. El sistema de agitación se completa con cuatro o seis deflectores que tienen por finalidad cortar o romper el movimiento circular que imprimen las turbinas al líquido, generando de este modo mayor turbulencia y mejor mezclado.

El tanque está rodeado por una camisa por la que circula agua, lo que permite controlar la temperatura. Para tanques ma-

temperatura. Para tanques mayores que 1000 ó 2000 litros este sistema ya no es eficiente y es reemplazado por un serpentín que circula adyacente a la pared interior del tanque. Debe tenerse en cuenta que a medida que es mayor el volumen de cultivo también lo es la cantidad de calor generado (capítulo 5), por lo que se hace necesario una mayor área de refrigeración. Los tanque son de acero inoxidable y están pulidos a fin de facilitar la limpieza y posterior esterilización.

El aire que ingresa al biorreactor debe estar estéril, lo que se consigue haciéndolo pasar por un filtro cuyo diámetro de poro es de 0,45 micrones, que impide el paso de mircroorganismos y esporos.

En los reactores de tipo "air lift" (Figura 20) es el mismo aire inyectado al cultivo lo que promueve la agitación. Básicamente consiste en dos cilindros concéntricos y por la base de uno de ellos, por ejemplo el interior, se inyecta aire. De este modo se genera una circulación de líquido ascendente en el compartimento interno y descendiente en el externo, lo que favorece el mezclado.

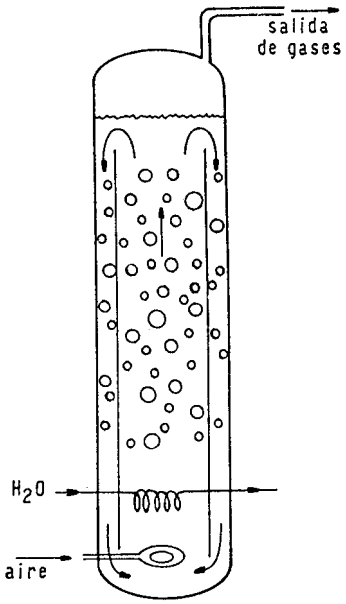


Figura 20. Esquema de un biorreactor del tipo "air lift". El mezclado se realiza mediante inyección de aire.

Transferencia de 0_2

La velocidad de transferencia de 0_2, $R0_2$, desde el seno de la fase gaseosa (burbujas) hasta la fase líquida está dada por la siguiente ecuación:

$$R_{O_2} = K_L a\,(C^* - C) \qquad (48)$$

donde KLa es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, C la concentración de 0_2 disuelto en el seno del líquido y C* la concentración de 0_2 disuelto que. estaría en equilibrio con la presión parcial de oxígeno de la fase gaseosa. El KLa depende del diseño del biorreactor, de las condiciones de operación (caudal de aire, agitación) y de la viscosidad del cultivo. A mayor viscosidad menor $K_L a$.

El $K_L a$ es una medida de la capacidad que posee un biorreactor para suministrar O_2 y el rango de valores usuales está comprendido entre 50 h^{-1} y 1000 h.

Es útil en este punto retomar el ejemplo visto al final del capítulo 5 y calcular el $K_L a$ necesario para que la velocidad de transferencia de 0_2 sea igual a la de consumo; esto significa que $R0_2$ deberá ser igual a 1,526 mg l^{-1} h^{-1}. Asumiendo que C* = 7,8 mg l^{-1} y C = 0,5 mg l^{-1}, resulta

$$K_L a = \frac{R_{O_2}}{C^* - C} = 209\ h^{-1}$$

Por tanto valores de K_La iguales o superiores al calculado asegurarán, para el ejemplo visto, que el cultivo no está limitado por 0_2. Cuando la velocidad de consumo del oxígeno varía con el tiempo, como ocurre por ejemplo en un cultivo "batch", el cálculo de KLa necesario se realiza empleando el máximo valor de rO_2 esperado, a fin de asegurar un adecuado suministro de 0_2 durante todo el cultivo.

Con este capítulo finaliza el tratamiento de los aspectos fundamentales de los procesos de fermentación. Resta tratar las aplicaciones de la Microbiología Industrial y las posibilidades que pueden presentarse en el futuro.

Como ejemplo de esas aplicaciones se incluyen en esta monografía los procesos correspondientes a la producción de levadura de panificación, penicilina y otro correspondiente al tratamiento de efluentes.

La producción de levadura es un proceso clásico de las primeras etapas del desarrollo de la Microbiología Industrial, mientras que el de penicilina representa un cambio fundamental en la evolución de nuestra disciplina, a partir de 1945. En ambos procesos se demuestra la integración de varios de los aspectos básicos tratados con anterioridad.

Finalmente la elección del tema de tratamiento de efluentes industriales responde a la trascendencia cada vez más importante que tiene el problema de la contaminación ambiental y a las soluciones que ofrece la Microbiología Industrial para encararlo.

Lecturas recomendadas:

1. *Principles of microbe and cell cultivation.* S.J.Pirt. Blackwel l Scientific Publications *(1975)*
2. *Fermentation kinetics and modelling.* C.G.Sinclair and B. Kristiansen. Ed. J.D. Bu'Lock. Open University Press *(1987).*
3. *Biochemical Engineering Fundamentals.* J.E. Bailey and D.F. Ollis. Mc Graw-Hill Book Company *(1986).*
4. *Biochemical Engineering. S.* Aiba, A.E. Humprey and N.F. Millis. Academic Press, *1973.*

Capítulo 8

PRODUCCION DE LEVADURA DE PANIFICACION

Introducción

Existe la evidencia de que el pan era conocido alrededor del año 2600 a.C. en Babilonia, y ya en el siglo 12 a.C. era producido normalmente con una tecnología establecida. Lógicamente esto implica que el hombre dominaba ya el uso de a levadura para levar la masa preparada con harina y producir así el pan.

En las primeras épocas se utilizaba la levadura obtenida de la fabricación de cerveza primero y de las destilerías después, hasta que finalmente se establecieron las plantas de producción de levadura durante el siglo 19.

Es posible que la primera planta de producción comenzó a operar en Holanda en 1780 con el llamado proceso Dutch que era anaerobio y que tenía sólo rendimiento del 4 al 6% con respecto a la materia prima usada. Posteriormente se mejoró el rendimiento, que pasó a ser del 12-22% con el proceso Vienna, también conducido sin aire, en 1846.

Con la introducción de la aireación en el proceso de producción, que tiene lugar en 1879, se aumentan considerablemente los rendimientos, que pasan a ser del 50 al 60% del teórico. La última etapa importante de modificación de la tecnología tiene lugar con la alimentación controlada de azúcar a los mostos en fermentación, cambio introducido por un científico danés, Sak, y un alemán, Hayduck, en 1919.

Este proceso conocido como "Zulaufverfahren" es la base de todas las tecnologías posteriores que se basan en los principios de los procesos "batch" alimentado ya considerados.

Los procesos de producción utilizaban granos como materia prima, hasta que el elevado costo de éstos produjo el reemplazo por las melazas de remolacha o de caña con las cuales pueden alcanzarse rendimientos cercanos al 100% del teórico. Actualmente se está tratando de encontrar otras fuentes de materias primas alternativas a las melazas, como el suero de leche hidrolizado.

La producción mundial de levadura prensada (27-30% de materia seca) es considerable ya que en 1983 estaba en el orden de 1,763,000 toneladas, con un valor de 473,000, 363,000 y 83,000 toneladas correspondiente a Europa occidental, Norte y Centro América, y Sud América respectivamente.

Con respecto al consumo anual per capita de levadura prensada (27-30% de materia seca) está en el rango de 1.5 a 2.1 Kg para los paises europeos, mientras que en paises de Sud América como Chile es de 1 Kg y en Argentina 0.6 Kg.

Cepas y medios de mantenimiento empleados

Inicialmente fue la levadura de cerveza, el *Saccharomyces uvarum, syn S. carlsbergensis,* el empleado con fines de panificación. Posteriormente se la reemplazó por la levadura de las destilerías, y por la llamada levadura de panificación, que es el *Saccharomyces cerevisiae.* Se han ensayado también muchas otras cepas, no sólo del mismo género sino también las pertenecientes a distintas espe-

cies de *Candida, Hansenula y Zygosaccharomyces*, aunque ninguna de ellas demostró poseer ventajas sobre el *Saccharomyces cerevisiae*.

El mejoramiento genético de cepas de *S. cerevisiae* de interés industrial para la producción de levadura prensada es dificultoso, porque no existe un conocimiento detallado de los genes comprendidos en las propiedades o características deseadas de dichas cepas. Las propiedades fundamentales son aquellas relacionadas con la producción, que resultan en un crecimiento rápido y altos rendimientos a partir de las melazas con el mantenimiento de las propiedades de panificación exigidas, que son el poder fermentativo y la estabilidad del producto. Estas propiedades dependen de muchos genes que intervienen en los ciclos de la glicolisis y de los ácidos tricarboxilicos, como así también en el metabolismo del nitrógeno y en la síntesis de hidratos de carbono de reserva.

Algunas cepas de interés industrial se han obtenido utilizando técnicas de hibridación que incluyen la fusión de protoplastos, ya explicada en el capítulo 3.

La obtención de híbridos para mejorar una cepa no es siempre exitosa, ya que los productos de fusión (híbridos) tienen que cumplir con todas las características exigidas por las levaduras comerciales, ya comentadas.

Es conveniente mencionar finalmente que el advenimiento de las técnicas de ingeniería genética ha abierto una nueva área de interés industrial en el campo de las levaduras. Sin embargo, hasta el presente esas técnicas no han sido de utilidad en la industria de la levadura de panificación, porque los logros alcanzados incluyen solamente propiedades bioquímicas relacionadas con pocos genes. Las cepas de levadura que han sido desarrolladas en los últimos años, permiten la producción de productos de interés farmacológico como la insulina, hormona de crecimiento bovina, interferón, vacuna contra la hepatitis B, se han originado en cepas de laboratorio definidas genéticamente y no en cepas de levaduras industriales.

Los medios de mantenimiento empleados por la industria son los siguientes:

1) Mantenimiento en medios de cultivo sólidos y repiques periódicos (cada 3 a 6 meses) en medio fresco, 2) bajo aceite mineral, 3) congeladas a -20 °C y después a -55 °C en medios que contienen leche o glicerol, 4) liofilización, y 5) mantenimiento a muy baja temperatura, en nitrógeno líquido (-196 °C).

Tal vez el método más satisfactorio sea el de la liofilización, aunque pueden emplearse con éxito cualquier otro método que asegure la estabilidad, o sea que no se produzcan cambios en las propiedades bioquímicas de microorganismo.

Requerimientos nutricionales

Tal como se trató en el capítulo 4, los requerimientos nutricionales de los macroelementos más significativos pueden deducirse del conocimiento de la composición centesimal de las células. En el capítulo mencionado se estableció también la ecuación de formación de 100 g de levadura seca a partir de 200 g de sacarosa.

De las fuentes de carbono y energía que pueden emplear el *Saccharomyces cerevisiae* figuran en primer lugar la glucosa y la sacarosa, aunque también pueden emplearse fructuosa, galactosa, maltosa y suero hidrolizado, ya que la levadura de cerveza no puede asimilar lactosa. También puede utilizarse etanol como fuente de carbono.

El nitrógeno asimilable debe administrarse en forma de amoníaco, urea o sa-

les de amonio, aunque también se pueden emplear mezclas de aminoácidos. Ni el nitrato ni el nitrito pueden ser asimilados.

Aparte de carbono y el nitrógeno los macroelementos indispensables son el fósforo que se emplea comunmente en forma de ácido fosfórico y el Mg como sulfato de magnesio, que también provee S. Finalmente son también necesarios el Ca, Fe, Cu y Zn como elementos menores. Por ejemplo, se ha establecido que S. *cerevisiae* requiere 200 ug de Zn, 75 ug de Fe y 12-15 ug de Cu por litro de medio para crecimiento óptimo.

Un requerimiento esencial está constituido por las vitaminas del grupo B como biotina, ácido pantoténico, inositol, tiamina, pyridoxina y niacina. Existen sin embargo algunas diferencias entre las distintas cepas. Entre las vitaminas mencionadas la biotina es requerida por la casi totalidad de las mismas. Los requerimientos cambian según las condiciones de cultivo, ya que el aumento de la aerobisis disminuye los requerimientos de esa vitamina y el uso de urea como fuente de nitrógeno los aumenta por la necesidad de biosíntesis de 3 sistemas enzimáticos que contienen biotina. Se ha estimado que los requerimientos de la biotina son de 100 ug de biotina por 100 g de azúcar suministrados para el crecimiento de la levadura. El ácido pantoténico, que es un componente de la coenzima A, es también requerido por muchas especies, mientras pocas especies requieren inositol. Con respecto a la tiamina se ha demostrado que aumenta la actividad fermentativa de la levadura.

Finalmente debe mencionarse al 0_2 como otro requerimiento nutricional para la producción de levadura. Como se estableció anteriormente se necesita 1 g de 0_2 para la producción de 1g de levadura seca en el caso de crecimiento en condiciones óptimas. El 0_2 se suministra con el aire que se inyecta en los medios durante la fermentación. Si existe limitación de 0_2 no se puede alcanzar los rendimientos óptimos que como vimos deben estar cercanos al 100% del teórico.

La velocidad de transferencia de 0_2 requerida depende del proceso empleado. Si la máxima velocidad de alimentación es de 10 g de azúcar l^{-1} h^{-1} se puede lograr una productividad de 5 g l^{-1} h^{-1} de materia seca, y para la cual se requiere una velocidad de transferencia de 5 g de O_2 1-1 h-1 que debe ser suministrada por el equipo. Tal como se mencionó en el capítulo 7 se debe asegurar por lo tanto un valor de coeficiente $K_L a$ que asegure esa valor de transferencia de oxígeno para que no exista limitación por el oxígeno. En el ejemplo citado el valor de $K_L a$ necesario es de 685 h^{-1}.

Cinética de crecimiento y rendimientos

Los valores normales de la velocidad específica de crecimiento para levaduras están en el orden de 0,45 a 0,6 h^{-1} como máximo.

Como en realidad se utilizan para la producción de procesos tipo batch alimentado la cinética del proceso, ya considerada, predice un aumento de XV igual a

$$XV = X_0 V_0 + Y_{x/s} \int_0^t F S_1 \, t \, dt$$

donde los diferentes términos tienen el significado ya visto en el capítulo 7.

En la práctica comercial de la producción de levadura, la alimentación no es constante sino que se realiza según programas propios de cada industria. La aplicación de la ecuación logarítmica para calcular p debe hacerse con precau-

ción, ya que u no es constante sino que va disminuyendo en función del tiempo, salvo en casos de alimentación programada para mantenerla constante durante intervalos cortos con una finalidad específica de calidad.

La relación entre la velocidad específica de crecimiento y la concentración de sustrato puede ser representada por la ecuación de Monod. Para *S. cerevisiae* se ha establecido un valor de K_s igual a 25 mg glucosa l^{-1}, siendo u dependiente de la concentración de sustrato por debajo de $S = 10\ K_s$, o sea 250 mg l^{-1}.

La eficiencia de un proceso industrial de producción de biomasa como es el caso de la levadura se mide fundamentalmente en base al valor $Y_{x/s}$, ya discutido con anterioridad en esta monografía. Los valores óptimos a partir de azúcares es tán alrededor de 0.5 g de biomasa seca por g de azúcar asimilada. En el caso de emplearse etanol, $Y_{x/s}$ puede alcanzar valores de 0.78 a 0.80.

Con el aumento de la concentración del sustrato puede aumentarse u pero disminuye $Y_{x/s}$ porque se favorece la fermentación alcohólica, aún en exceso de 0_2 según el fenómeno Crabtree ya mencionado anteriormente. Debido al mismo rendimiento celular es función de u, y cuando esta es superior a 0.2 el rendimiento celular baja. Es por ello que ese valor es raramente excedido en la práctica industrial. La temperatura óptima del proceso se ha establecido en 28.5 °C; a mayores temperaturas disminuye el rendimiento, probablemente debido al aumento de energía de mantenimiento.

El rendimiento celular puede también afectarse por la presencia de inhibidores como S02, ácido aconítico y metales pesados o restos de herbicidas o bactericidas que pueden estar presentes en las melazas.

Producción comercial de levadura prensada

La producción comercial de levadura de panificación es llevada a cabo en un proceso a múltiple etapa, de las cuales las primeras se realizan en batch, y las últimas en batch alimentado. Se han mencionado prácticas comerciales de procesos de 8 etapas que conducen a una producción final de 100 toneladas de levadura prensada en 2 semanas y otra en 5 etapas con una producción comercial de 125 ton. en 65 h. Como aspectos esenciales de la producción comercial, se deben considerar el medio, el proceso de producción y las etapas de separación, lavado y empaquetado.

Medio de producción

Como ya se mencionó la materia prima elemental de elección es la melaza de remolacha o de caña o ambas en conjunto, cuando se las dispone.

Los aspectos fundamentales a considerar son la disponibilidad y la composición de la melaza incluyendo la presencia de inhibidores o substancias extrañas que pueden contener. En la tabla 5 figura la composición media de las melazas de caña y remolacha.

La sacarosa es el azúcar predominante en ambas melazas. La materia orgánica no azúcares en la melaza de caña está compuesta fundamentalmente por gomas solubles y ácidos orgánicos sobre todo aconítico y compuestos nitrogenados. En el caso de la melaza de remolacha los no azúcares están constituidos por un mayor porcentaje de compuestos nitrogenados como betaína y ácido glutámico y algunos ácidos orgánicos como láctico, málico, acético y oxálico. En las cenizas

Tabla 5. Composición media de melaza de caña y remolacha.

	Melaza de Caña	Melaza de Remolacha
Materia seca	75%	74-78%
Azúcares totales	48 - 56%	48 - 57%
Materia orgánica no azúcares	9 - 12 %	12 - 17%
Cenizas sulfatadas	10 - 15%	10 - 12%
Vitaminas (mg Kg^{-1})		
Biotina	1.2 - 3.2	0.4 - 0.13
Acido fólico	0.04	0.2
Inositol	6,000	5,800 - 8,000
Pantotenato de Ca	54 - 64	50 - 100
Piridoxina	2.6 - 5	5.4
Riboflavina	2.5	0.4
Tiamina	1.8	1.3
Acido nicotínico	30 - 800	20 - 45
Colina	600 - 800	400 - 600

predomina en ambas melazas el K, teniendo mayor porcentaje de fósforo la melaza de caña que la de remolacha.

Es interesante comparar el contenido de las vitaminas de ambas melazas por la importancia que tienen estos compuestos en la producción de levadura. Como puede verse el contenido de biotina es superior en la melaza de caña y el de pan totenato de Ca en la remolacha. La melaza de remolacha tiene mayor cantidad de compuestos nitrogenados asimilables. Es por ello que los fabricantes prefieren, si tienen disponibilidad suficiente, utilizar mezclas de ambas melazas.

Con respecto a componentes extraños (que pueden afectar el rendimiento) se han detectado en las melazas algunos pesticidas en el caso de melazas de caña como lindane, aldrin, heptaclor, dieldrin, etc. en cantidades variables desde trazas hasta 0.21 $mgKg^{1}$ en el caso del lindane en melazas de cañas de Honolulu.

Las melazas se utilizan generalmente diluídas al 50%. Como los compuestos coloidales de la melaza de caña pueden causar problemas en las varias etapas del proceso de fermentación, el mosto es casi siempre clarificado. La clarificación puede hacerse antes o después de la esterilización, que se realiza en la última etapa por inyección de vapor directa, a la presión atmosférica en la mayor parte de los casos.

La clarificación se realiza fundamentalmente con la ayuda de centrífugas intermitentes. Se han mencionado como ventajas de utilizar mostos clarificados que la levadura es más fácil para prensar y secar y que además, la clarificación probablemente facilita la transferencia de O_2 y reduce la formación de espuma.

La melaza es deficiente en algunos macroelementos como N, P, S, Mg, y también Zn en la mayoría de los casos, por lo cual es necesario su agregado a los mostos. La cantidad de nitrógeno y fósforo a ser agregado depende de las prácticas comerciales. El nitrógeno puede representar entre el 6.5 y el 10% de la levadura seca y el P expresado como $P_2 0_5$ varía entre 1.5 y 3.5%. Ambos valores,

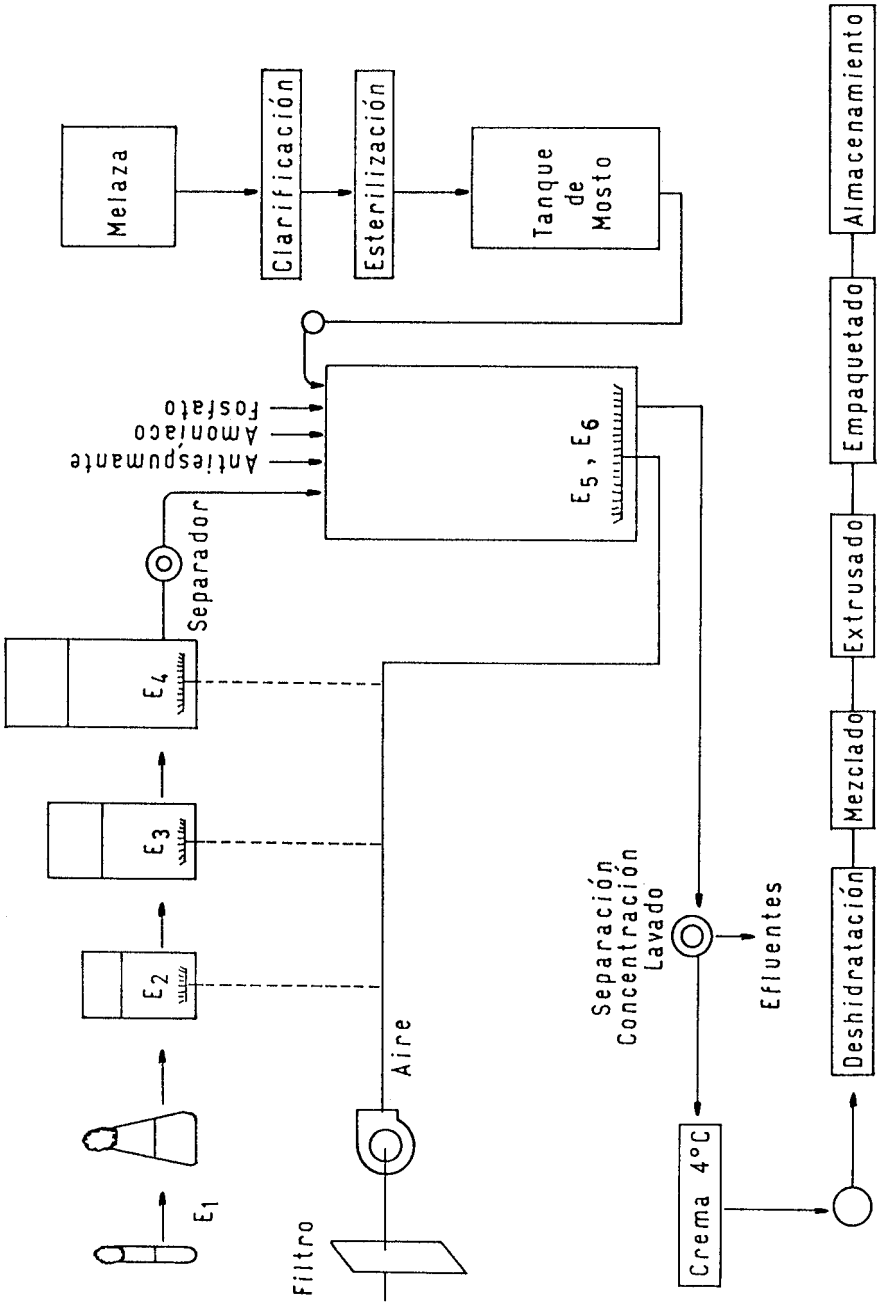


Figura 21. Esquema de la producción de levadura prensada.

sobre todo el contenido de nitrógeno, está relacionado con el poder fermentativo y la estabilidad de la levadura en el almacenamiento. El nitrógeno que se suministra generalmente como agua amoniacal y el P como ácido fosfórico, son alimentados durante el proceso de acuerdo a programas de alimentación que dependen de las prácticas comerciales. El Mg, S, y Zn son incorporados en forma de sulfatos. El $MgS0_4$ se suele incorporar a razón de 1 g de la sal heptahidratada y el Zn en una proporción de 10 mg del sulfato tetrahidratado por Kg de melaza a fermentar.

Si se utiliza melaza de remolacha es indispensable agregar biotina, lo que se hace adicionando la droga pura o preferentemente, como es más económica, en forma de destiobiotina. Es a menudo indispensable agregar tiamina y ácido pantoténico.

Proceso de producción a múltiple etapa (Figura 21)

Un proceso típico de producción comprende una primera etapa (E_1) que se realiza en frascos conteniendo medios de melaza o,de malta con un 5% de azúcares durante 2-4 días. A continuación siguen 3 etapas consecutivas (E_2, E_3 y E_4) realizadas en "batch" en condiciones estériles en fermentadores en escala creciente hasta 30 m^3. El tiempo de la etapa E_2 es normalmente 24 y las etapas siguientes 9-11h. El número de etapas a emplear depende de la cantidad de levadura a emplear en las etapas siguientes. La concentración del sustrato inicial está entre 5-7.5% azúcares. El factor crítico en esta etapa reside en la necesidad de emplear medios estériles para evitar contaminaciones prematuras que pueden perjudicar las etapas posteriores.

Las etapas siguientes E_5 y E_6 se realizan empleando el sistema de "batch" alimentado y en condiciones de alta aireación y con el mosto de melaza que ha sido sometido a un cocimiento a 100 °C. Algunos fabricantes utilizan el inóculo proveniente de la E_4 para sembrar un único fermentador, realizando así solamente una etapa (E_5), siendo la razón principal de este procedimiento la necesidad de limitar al máximo la contaminación que se puede producir en la etapa final. También por ese motivo cuando se realiza la etapa E_6, la anterior (E_5) suele realizarse a menor pH, en tiempos cortos y altos valores de velocidad de crecimiento a expensas del rendimiento. La etapa final, que es la llamada comercial se conduce para aumetar la capacidad leudante, la estabilidad en el almacenamiento y maximizar también el rendimiento. Todo esto se logra manipulando algunos parámetros como el pH, aireación y velocidad de alimentación del medio. Esta última es particularmente importante, existiendo varios programas de alimentación que tienen que considerar además de maximizar el rendimiento, la calidad de la levadura a obtener relacionada con el poder fermentativo y la estabilidad.

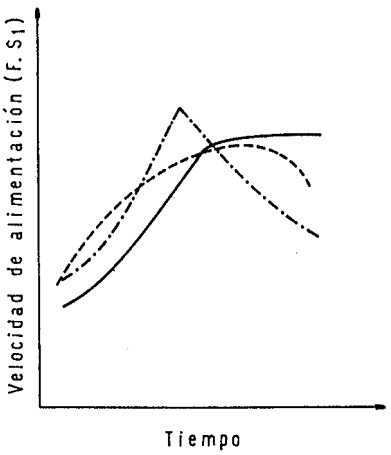


Figura 22. Diversos sistemas de alimentación de mostos de melazas utilizados en la industria.

En la Figura 22 se observan algunos programas de alimentación de la melaza utilizados en la industria-. Para alcanzar rendimientos aceptables, que pueden ser cercanos al 0.5 g por g de azúcar, la concen-

tración de la fuente de carbono debe mantenerse debajo de ciertos límites (menor a 0.16 gl^{-1}) para evitar la producción de alcohol. El tiempo de proceso para la última etapa puede variar entre 10 y 20 h durante el cual la población de levadura puede multiplicarse entre 6 y 7 veces. Un proceso correctamente conducido debe facilitar lo que se denomina "maduración" de la levadura, que se logra manteniendo el mosto fermentado una hora más después del agregado de nutrientes con una aireación muy suave. Durante este período, los sustratos no empleados hasta ese momento son asimilados, y las células con brotes completan su desarrollo.

Separación, lavado y empaquetado

Al final de la etapa de producción comercial las células de levaduras son separadas por centrifugación y lavadas en una o más etapas. Las operaciones de lavado son realizadas para reducir los sólidos no debidos a levaduras que pueden dificultar la filtración y oscurecer el color de la levadura prensada. La eficiencia del sistema de lavado está determinada por la concentración de los sólidos de levadura, la cantidad del agua usada y el contenido de sólidos del agua de dilución que tiene importancia cuando el agua de lavado se utiliza en contracorriente a la crema de levadura.

El proceso de separación produce una crema de levadura ligeramente coloreada conteniendo hasta 22% de sólidos debidos a células y prácticamente libres de otros materiales. La crema es almacenada en tanque agitados a 2-4 °C con ajuste de pH a 2.5-3.5.

Como la mayor parte de la levadura se vende como levadura prensada conteniendo entre 27 y 30% de materia seca, es necesario realizar una etapa de deshidratación de la crema (que contiene un 18-22% de sólido) hasta esos valores, lo que se efectúa con filtros prensas o filtros rotatorios. Finalmente la levadura es extrudada en forma de panes de peso variable según las exigencias del mercado, que son envueltos en papel celofán o en otro tipo adecuado de papel.

Otra forma de terminar el proceso de producción es someter la crema de levadura a un filtrado y extrudado para producir partículas de 0.5 a 2 mm que son secadas en equipos de lecho fluidizado, lo que da origen a las llamadas levaduras secas activas o levaduras instantáneas con bajo contenido de humedad, que se envasan al vacío o en atmósfera de nitrógeno y que pueden conservarse por períodos prolongados a temperatura ambiente.

Control de calidad

La levadura prensada producida por el proceso descripto debe cumplir con las exigencias impuestas al cual está destinada, o sea para la panificación. La función fundamental que debe cumplir es levar las masas preparadas con harina y conservar esas cualidades durante un tiempo adecuado.

Existen diversas técnicas de control que se utilizan para verificar la calidad de la levadura comercial. Todas se basan en la preparación de una masa con harina, agua y sal, además de levadura. En algunos casos se mide el tiempo en minutos que tarda en levar una masa preparada en una mezcladora en condiciones estandarizadas, que es colocada en un molde a temperatura de 30 C tomando como referencia un tope que esta conectado a una alarma que suena cuando es alcanzado por la masa.

En otro tipo de técnica mejor cuantificada se mide el volumen de CO_2 desprendido en condiciones controladas, a 120 y 165 minutos después de colocar la masa en un balón conectado a una bureta donde se va almacenando el CO_2 desprendido.

Para evitar las diferencias entre las distintas harinas y tratar de lograr resultados más reproducibles la IUPAC sugirió un método basado en la utilización de una mezcla de almidón y goma garrofin (proveniente del fruto de la *Seratonia siliqua)* en lugar de harina. Otro ensayo importante está relacionado con el tiempo que la levadura conserva sus características, que se mide manteniendo el pan de levadura en estufa a 30 °C.

Lecturas recomendadas:

1. *Comprehensive Biotechnology*. *The practice of Biotechnology: Current Commodity Products.* Volume 3. Ed. Harvey W. Blanch, Stephen Drew and Daniel Wang. Pergamon Press (1985)
2. *Progress in Industrial Microbiology*. *Vol 23.* Ed. M.R.Adams. Elsevier (1986).
3. *Microbial Technology*. *Vol. I, 2da.* Ed. H.J.Pepple r y D. Perlman. Academic Press (1979).

Capítulo 9

PRODUCCION DE PENICILINA

Introducción

Los antibióticos son por definición moléculas con actividad antimicrobiana, que incluyen una gran cantidad de compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas. Son metabolitos secundarios, producidos en la mayoría de los casos después de la fase de crecimiento. Los primeros procesos para la producción de penicilina, que fue el primer antibiótico conocido, implicaban el crecimiento de *Penicillium notatum* sobre la superficie de un medio líquido (Czapek-Dox-glucosa). El período de incubación era usualmente de 6-12 días y posteriormente la penicilina se extraía con solventes previa separación del micelio.

La historia de las innovaciones en la producción de penicilina comenzó en 1945 con el descubrimiento de una nueva especie, P. *chrysogenum*, la cual permitió incrementar los rendimientos del producto y trabajar en cultivo sumergido empleando lactosa como fuente de carbono y energía, y agua de macerado de maíz (corn-steep liquor) como fuente de nitrógeno. De esta época es también el hallazgo de que precursores tales como el fenilacetato incrementan los rendimientos del antibiótico, produciéndose en este caso predominantemente penicilina G en lugar de una mezcla de distintos tipos.

En la Figura 23 se muestra un esquema de la biosíntesis de penicilina. Las distintas penicilinas son producidas a partir de P. *chrysogeizuin* por adición de una apropiada cadena carboxílica en cantidad adecuada en el medio de cultivo, pero solamente tienen valor terapéutico la penicilina G y la V. Ambas tienen un espectro y actividad similar, pero la penicilina V es más estable a pH ácido, lo que permite su administración por vía oral.

La producción de penicilina como otros procesos biotecnológicos está dominada por su aspecto competitivo entre los grandes laboratorios productores, que realizan permanentes esfuerzos de mejoramiento en cada área del proceso: cepa, fermentación y separación. El proceso a grandes rasgos implica el cultivo de P. *chrysogenum* en reactores de volumen creciente hasta una escala de 500.000 1, separación del micelio por filtración y extracción del antibiótico del caldo, seguida por la cristalización o precipitación ácida del mismo.

Cepas, medios de mantenimiento e inóculos

Normalmente la cepa de producción es mantenida como esporos, liofilizados o en nitrógeno líquido. Otra alternativa es mantener el desarrollo vegetativo en N_2 líquido o congelado a -70 °C.

Antes de comenzar un proceso a partir de un cultivo, el operador debe realizar una exhaustiva evaluación que asegure el mantenimiento de las características de la cepa, lo cual implica determinar el grado de esporulación, la productividad y características morfológicas, lo que incluye ensayos en agitadores y en fermentadores de laboratorio.

Muchos son los factores que se asocian en la síntesis de antibióticos, tales como esporulación, velocidad de crecimiento y niveles de intermediarios, todos los

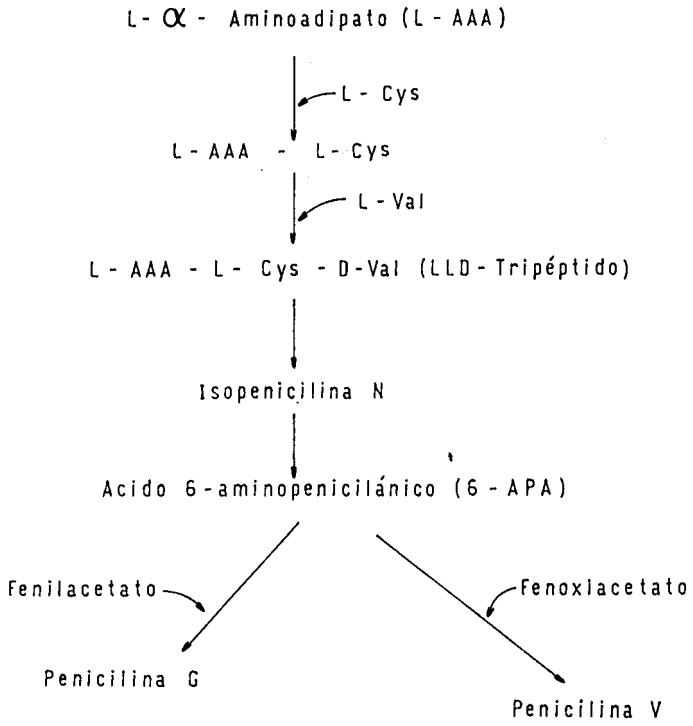

L- α - Aminoadipato (L - AAA)
L - Cys
L - AAA - L - Cys
L - Val
L - AAA - L - Cys - D-Val (LLD - Tripéptido)
Isopenicilina N
Acido 6-aminopenicilánico (6 - APA)
Fenilacetato
Fenoxiacetato
Penicilina G
Penicilina V

Figura 23. Ruta biosintética de la formación de penicilina en *P. chrysogenum.*

cuales son regulados de una manera compleja por muchos genes. Esto puede. ser el motivo por el cual las mutaciones con agentes físicos (luz UV, rayos X) y químicos, han tenido un gran éxito en el mejoramiento de cepas. Entre 1950 y 1980 la concentración de penicilina obtenida fue incrementada desde 1000 U ml^{-1} a cerca de 60.000 - U ml^{-1} (0.5 a 35 mg ml^{-1}). Este mejoramiento fue posible no solamente por modificaciones en la cepa, sino también por la tecnología del proceso, como la ingeniería de aireación y sistema de mezclado en fermentadores, alimentación continua de glucosa, empleo de electrodos de pH para el control del mismo, y utilización del sistema continuo.

Las técnicas genéticas se han utilizado de dos formas para el mejoramiento del proceso. En primer lugar el empleo de mutantes bloqueados ha permitido el conocimiento de las rutas biosintéticas y de apropiadas ténicas de selección. En segundo lugar, las técnicas de fusión de protoplastos y procesos parasexuales fa= cilitaron la obtención de recombinantes con rendimientos superiores a los de las cepas originales y con expresiones estables. Además esto permitió la obtención de organismos productores de nuevos antibióticos.

El empleo de técnicas de mejoramiento genético posibilitó entonces el aumento de rendimientos y la obtención de nuevas cepas que no producen pigmentos, lo cual ha sido de gran importancia en las etapas de extracción y purificación.

Otro aspecto importante en el mejoramiento de cepas se refiere a la morfología celular. En este sentido, si bien es conocido que la morfología de un hongo en

cultivo sumergido puede ser controlada por el nivel de inóculo y por el medio, es posible influir sobre la misma por alteración del genotipo. Así se han seleccionado cepas de P. *chrysogeytum*, que dan menor viscosidad en los caldos, incrementando la transferencia de oxígeno. Las técnicas de recombinación tienen una cierta ventaja sobre las de mutación y selección, porque en este caso se deben estudiar un menor número de mutantes.

Las etapas de desarrollo del inóculo se llevan a cabo a 25 °C en erlenmeyers y fermentadores agitados. Los medios empleados en estas etapas incluyen "corn steep liquor" como fuente de nitrógeno, glucosa o sacarosa 2% (p/v), carbonato de calcio 0.5 - 1% (p/v) como "buffer" y sales inorgánicas. Cuando la fuente de carbono empleada en la escala de producción es la lactosa, se la incluye a menudo en la etapa final con glucosa o sacarosa, de forma de inducir la B-galactosidasa y permitir así una rápida iniciación del proceso en el fermentador de producción.

Requerimientos nutricionales y específicos

Además de glucosa y lactosa, *Peiticillittm chrysogenum* puede utilizar una gran variedad de fuentes de carbono y energía. Alternativamente se han usado sacarosa, almidón, dextrinas, melaza, aceites vegetales y animales, etanol y glicerol.

Un medio de cultivo en sistema batch puede contener entre 30 y 40 g. 1^{-1} de lactosa, en tanto que si se emplea un cultivo con alimentación de fuente de carbono, se puede utilizar glucosa o melaza a una concentración final de 100 g 1^{-1}.

La principal fuente nitrogenada empleada hasta la década del 70 fue "corn-steep liquor" debido a que aumentaba los rendimientos del antibiótico probablemente al suministrar compuestos como aminoácidos, factores de crecimiento, precursores de la cadena lateral, además de elementos trazas. Sin embargo, dada la variabilidad del producto entre distintas partidas, los problemas de suministro, y también debido a la introducción de precursores específicos de la cadena lateral, las industrias buscaron reemplazarlo. Los productos alternativos son la harina de semilla de algodón, extractos y peptonas, y la harina de soja. Sin embargo en algunos casos estos productos son igualmente variables y tanto o más caros.

En 1976 se demostró la importancia de un suministro continuo de amonio (por alimentación con $(NH_4)_2SO_4$), que permitiese mantener niveles del mismo de aproximadamente 20 mM. Trabajando en cultivos alimentados y modificando la relación nitrógeno/carbono en la alimentación, se comprobó que cuando el cultivo estaba limitado en nitrógeno cesaba la producción de penicilina, la cual se restablecía al ser la fuente de carbono la limitante. El requerimiento de grandes cantidades de NH_4^+ podría reflejar su necesidad para la síntesis de glutamato, el cual es requerido para producir valina y cisteína.

El azufre se incorpora como $(NH_4)_2SO_4$ y con la fuente de nitrógeno orgánica (extractos, peptona). El fósforo en forma inorgánica se adiciona como sales de fosfato y se aconseja mantener su concentración entre 250 y 500 mg 1^{-1} con alimentación continua. Además se debe tener en cuenta que el "corn-steep liquor" es una fuente importante de fósforo.

Si se desea obtener un determinado tipo de penicilina, se debe incluir inicialmente, o bien por alimentación en los medios, una cantidad relativamente grande de precursor. El requerimiento teórico de fenilacetato sódico, es 0.47 g g^{-1} de penicilina G ácida, y de fenoxiacetato de sodio, 0.50 g g^{-1} de penicilina V ácida.

Es aconsejable efectuar una alimentación continua de estos componentes para evitar la toxicidad de los mismos sobre la cepa y la hidroxilación por acción del organismo.

Parámetros de producción

La cantidad de penicilina obtenida en un fermentador (PV) es función de la concentración de células (X), de la velocidad específica de producción de penicilina (q_p), del tiempo de fermentación (t) y del volumen de medio de cultivo (V).

$$PV = P_0 V_0 + \int_{t_o}^{t_f} q_p XV \, dt \qquad (1)$$

donde P = concentración de penicilina al tiempo t_f

P_o = concentración inicial de penicilina

$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$ velocidad específica de producción de penicilina (unidades $mg^{-1} h^{-1}$)

t = tiempo de inoculación

t_f = tiempo de cosecha

V_o = volumen inicial

V = Volumen al tiempo t

Evidentemente el objetivo es alcanzar altos valores de X y de q_p.

Desde 1950 la velocidad de producción de las cepas ($q_p X$) se ha incrementado 40 veces (desde 10 unidades $ml^{-1} h^{-1}$ a 400 unidades $ml^{-1} h^{-1}$).

Entre los factores que afectan q_p se tienen el pH, la temperatura, la aireación y la velocidad específica de crecimiento. El pH óptimo debe ser mantenido alrededor de 6.5, lo cual permite además minimizar la hidrólisis de penicilina a ácido peniciloico. Se debe tener en cuenta que el pH puede no ser constante debido a que el valor óptimo para crecimiento puede ser diferente del de formación de producto.

Los pocos estudios realizados con respecto a la temperatura indican que el valor óptimo para crecimiento es de aproximadamente 30 °C, en tanto que el óptimo de producción oscila entre 20 y 25 °C. Para un proceso "betch" la temperatura puede variar entre 23 y 28 °C, en tanto que para el "batch" alimentado esa variación está entre 25 y 27 °C.

La aireación presenta un problema especial en esta fermentación, debido a que al incrementarse la biomasa, y por consiguiente la demanda de 0_2, aumenta también la viscosidad del medio, lo cual crea una resistencia importante para la transferencia de oxígeno. Por lo tanto puede ocurrir que por encima de un cierto valor de X el suministro de oxígeno pueda ser insuficiente para mantener un q_p máximo por un determinado tiempo. Para superar estos problemas se puede incrementar la potencia de agitación, el caudal de aire, la presión dentro del reactor, cambiar las condiciones de cultivo o incluso trabajar con cepas modificadas

que no aumenten la viscosidad. Todo esto indica la necesidad de un adecuado manejo del proceso y del diseño del reactor.

En un cultivo "batch" la velocidad específica de producción de penicilina alcanza valores altos al final del crecimiento exponencial, cayendo posteriormente como se muestra en la Figura 24.

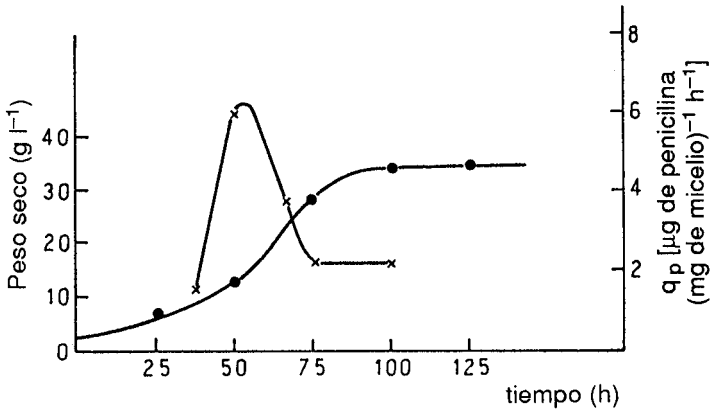


Figura 24. Obtención de penicilina en sistema "batch". Variación de X (●) y q_p (x) en función del tiempo.

Si la producción se opera en sistema "batch" alimentado el objetivo es obtener tanta biomasa como sea posible (término X de la ecuación 1) la cual debería producir penicilina a una alta velocidad específica (q_p en ecuación 1) por el mayor tiempo posible. Se ha observado que el máximo valor de q_p es de aproximadamente 15 unidades por mg $^{-1}$ h^{-1}, el cual se alcanza al comienzo de la fermentación y luego declina. Por otra parte los productores obtienen alrededor de 60.000 unidades ml^{-1} en 200 h de proceso, lo que significa una productividad media de 300 unidades ml^{-1} h^{-1}. Por lo tanto si la máxima biomasa alcanzada es de 50 mg ml^{-1} para un q_p de 15 unidades mg^{-1} h^{-1}, la máxima productividad debería ser de 750 unidades ml^{-1} h^{-1}, lo que indica que el promedio obtenido es menos de la mitad del máximo. Lo expuesto indica la importancia de mantener un q_p elevado. En este sentido se ha determinado cómo influye sobre este valor, la velocidad específica de crecimiento.

El valor de u para la fase de producción, tiene un límite superior, el cual si es superado, la biomasa requiere un exceso de oxígeno que lleva a una disminución de q_p, si existe una limitación del mismo en el reactor. El límite inferior de u para la producción varía con la cepa utilizada.

En sistemas de cultivo con alimentación con glucosa, el valor de q_p varía linealmente con u hasta una velocidad de alimentación de glucosa cuyo valor oscila alrededor de 0,33 m moles de glucosa (g biomasa)$^{-1}$ h^{-1}, el cual corresponde a un u de 0,015 h^{-1}. A mayores valores de velocidad de alimentación u se incrementa linealmente pero q_p permanece constante (Figura 25). El valor mínimo de u debajo del cual q_p desciende linealmente con u se denomina u crítico (u_c). No se conocen con precisión las causas de esta disminución.

El problema por lo tanto es determinar qué factores de la biomasa o del entorno limitan el valor de q_p para tratar de superarlos. Si el oxígeno es el limitante del crecimiento, se demuestra una relación lineal entre el valor de u y la velocidad específica de consumo de oxígeno (qo2). De lo anteriormente expuesto se deduce que durante la fase de producción o crecimiento lento en un sistema de producción industrial "batch" alimentado (la glucosa es el sustrato limitante) se deberán mantener valores adecuados de u y q02 para lograr un q_p apropiado.

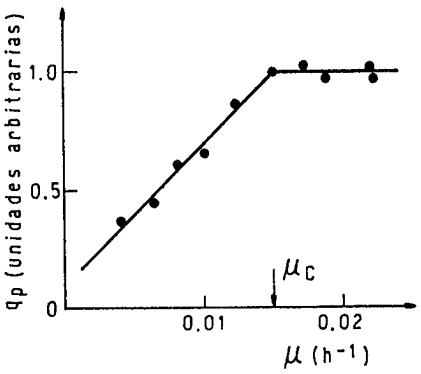


Figura 25. Relación entre la velocidad específica de producción de penicilina y la velocidad específica de crecimiento.

Para la mayoría de las fermentaciones industriales el u de producción es menor de 0.01 h^{-1}. Se debe cuidar en esta fase no tener un exceso de glucosa debido a que el mismo puede ocasionar una inhibición de la actividad o de la síntesis de enzimas involucradas en la biosíntesis de penicilina. A pesar de que la limitación de hexosa disponible es esencial para el éxito del proceso, el valor de u puede ser controlado por otros nutrientes, habiéndose demostrado que la elección del nutriente limitante (oxígeno, fósforo, sulfato, amonio, magnesio) tiene un efecto marcado sobre el metabolismo energético.

La relación entre q_p y u podría indicar la necesidad de prolongar un estado fisiológico particular de las células. Se ha comprobado por estudios en cultivo continuo que existe una correlación entre la velocidad específica de crecimiento y la morfología celular, la cual corresponde a un estado fisiológico determinado. Para un valor de p mayor de 0,023 h^{-1} se observa solamente crecimiento vegetativo, en tanto que debajo de 0,014 h^{-1} comienza a tener lugar la formación de conidias.

Debido a que bajas velocidades de crecimiento son de gran importancia en muchos procesos fermentativos, es una necesidad dilucidar para esos casos que funciones celulares tienen lugar. Luego, se podría estabilizar la función deseada, como producción de penicilina, por períodos prolongados de tiempo. Un valor mínimo de u podría indicar también la necesidad de reemplazar células viejas o alteradas, las cuales han perdido irreversiblemente su capacidad de síntesis de penicilina.

La duración de la fermentación de penicilina puede estar limitada por la capacidad de transferencia de oxígeno del reactor. Como ya se indicó, en algún momento la concentración celular puede exceder el suministro de oxígeno necesario para mantener un valor alto de q_p y la síntesis disminuye.

En algunos procesos la presencia de tóxicos, inhibidores o factores no conocidos pueden causar una disminución en el valor de qp, sobre todo al final de la fase de producción.

Tecnología del proceso

La tecnología de producción de penicilina presenta a nivel comercial aspectos particulares que son mantenidos en reserva por los productores, a pesar de que existe abundante bibliografía en el tema. Un esquema del proceso se observa en la Figura 26.

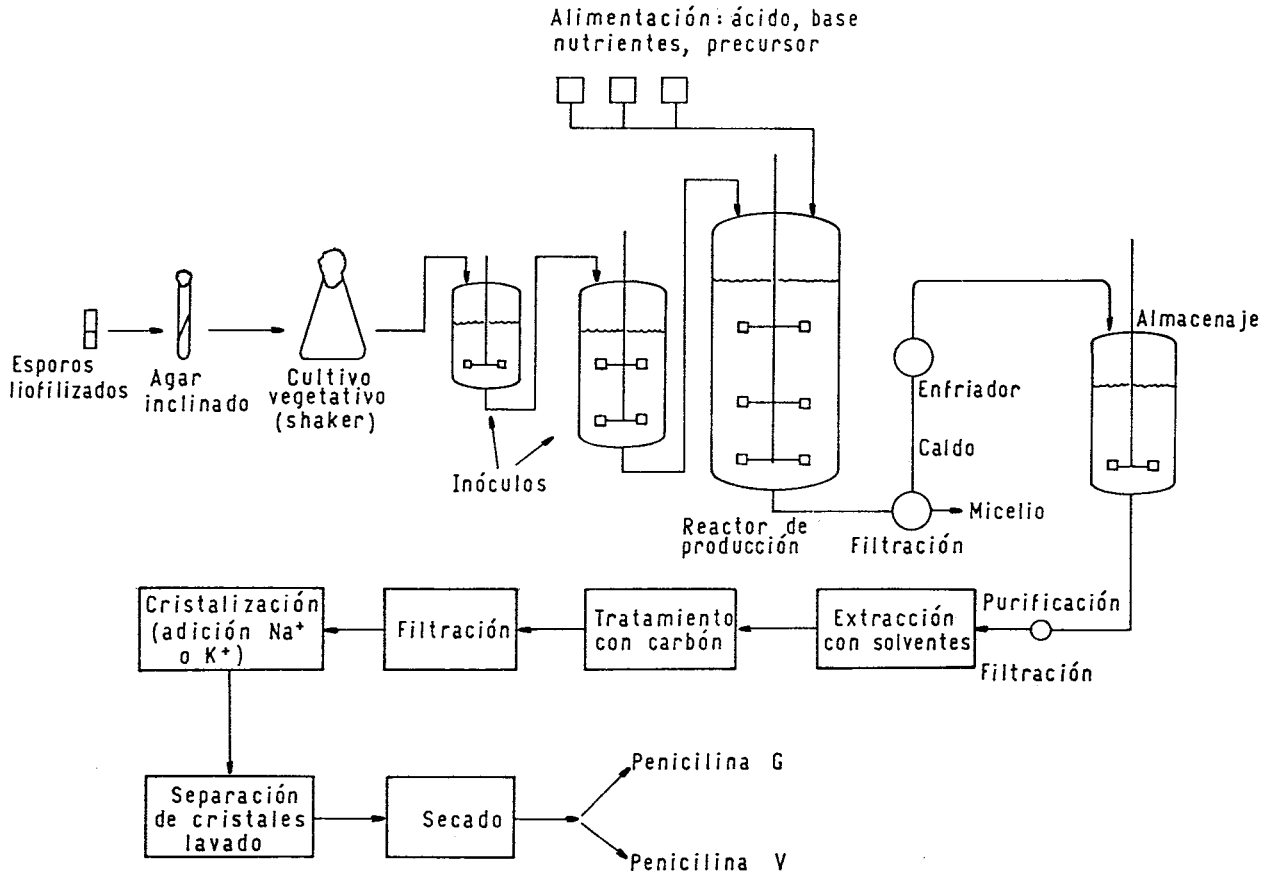


Figura 26. Esquema de la producción de penicilina.

La producción de penicilina G o V es llevada a cabo por fermentación en medios líquidos, empleando reactores cuyo volumen oscila entre 40,000 y 500,000 1. Este proceso es aeróbico y en general se emplea una relación de 0,5 - 1,0 volúmenes de aire (volumen de líquido)$^{-1}$ min^{1}. En una fermentación de penicilina típica, la mayoría de la masa celular es obtenida durante las primeras 40 horas de fermentación, a partir de un inóculo de 10% (v/v) de un cultivo vegetativo de 20 g l^{-1}. Luego el crecimiento continúa a un valor mínimo de p, el cual se debe regular si se quiere mantener un q_p elevado.

Durante la fermentación se debe controlar si el suministro de oxígeno es el requerido para mantener el valor deseado de q_p. Otro parámetro importante es la temperatura, y en este caso el diseño y operación del reactor es importante por el calor generado por el crecimiento y la agitación.

Los agitadores utilizados son en general de tipo turbina. La potencia introducida al cultivo es del orden de 1 - 4 W l^{-1}. Durante el proceso se controla la temperatura, caudal de aire, velocidad de agitación, pH y velocidad de agregado de nutrientes. La duración de la etapa de producción en el caso de operarse un sistema "batch" alimentado es del orden de las 200 h.

Actualmente la extracción con solventes es la base para la separación y purificación de la penicilina. El primer paso consiste en separar el micelio del medio de cultivo empleando un filtro rotatorio a vacío tipo cilíndrico. El filtrado rico en penicilina es luego enfriado en un intercambiador de calor a 0 - 4 °C con el objeto de disminuir la degradación enzimática y química durante las etapas de extracción posteriores.

Las penicilinas G y V son ácidos fuertes (pKa entre 2.5 - 3.1). Las formas ácidas son solubles en muchos solventes orgánicos y se pueden extraer con un alto rendimiento en acetato de amilo o de butilo a pH 2.5 - 3.0. La extracción se puede realizar en operaciones continuas, a contracorriente en extractores centrífugos en etapas múltiples, a temperaturas de 0 - 3 °C. Otra posibilidad es el empleo de mezcladores estáticos o decantadores, los cuales tienen en menor costo de inversión.

Se debe tener en cuenta que tanto la penicilina G como la V se degradan en medio ácido con una cinética de primer orden a una velocidad proporcional a la temperatura y recíproca con respecto al pH. Esto hace que la vida media en condiciones de eficiente extracción en medio ácido sea muy reducida. Sin embargo como la forma V en tales condiciones es más estable que la G, si el objetivo es obtener 6-amino penicilánico (6-APA) la producción de penicilina V es más aconsejable.

La extracción de penicilina se puede realizar en una o más etapas sucesivas, con una acidificación del caldo filtrado con H_2SO_4 o H_3PO_4 al 10% P/V y con el agregado de un agente surfactante (0,003 - 0,1% P/P, en el solvente), realizándose la extracción y concentración en extractores centrífugos. Dependiendo de las especificaciones de uso final, el solvente conteniendo penicilina se puede tratar con carbón para separar pigmentos y otras impurezas. Esta etapa actualmente no se realiza debido a las bajas impurezas de los caldos y a los altos rendimientos obtenidos.

La cristalización se puede realizar desde la fase acuosa si se desea, siendo los valores críticos las concentraciones de sodio o potasio, la temperatura, la concentración de penicilina y el pH. En caso de hacerse la cristalización a partir de un solvente se requiere también un exceso de Na^+ o K^+, siendo los cristales recuperados en un filtro rotatorio a vacío. Estos cristales son lavados y presecados con

un solvente volátil que también separa impurezas coloreadas. El secado definitivo se puede realizar con aire caliente, vacío o calor radiante.

La penicilina cristalina G o V así obtenida puede ser empleada como tal o como intermediario que es convertido a 6-APA para obtener nuevas penicilinas semisintéticas, cuidando en todos los casos que los productos deberán tener un grado farmacéutico. El ácido 6-APA puede ser obtenido por vía enzimática (penicilin acilasa) o química; sin embargo todas estas etapas escapan al alcance de esta monografía, por lo tanto se remite al lector interesado a la bibliografía.

Economía del proceso

Se atribuye un 80% del costo de producción de penicilina al proceso de fermentación y un 20% a las etapas posteriores de extracción y purificación. A su vez en el proceso fermentativo, un elevado porcentaje en los costos corresponde al medio de cultivo, en el cual la glucosa es el componente de mayor valor. El máximo rendimiento mencionado en esta fermentación es aproximadamente 0.1 g de penicilina por gramo de azúcar. El balance de materia para glucosa es el siguiente:

glucosa consumida	=	consumo para biomasa	+	consumo para energía de mantenimiento	+	consumo para penicilina

Podemos entonces escribir la siguiente ecuación:

$$r_s = \frac{\mu X}{Y'_{x/s}} + m_s + \frac{q_p X}{Y'_{p/s}}$$

donde $Y'_{p/s}$ es el rendimiento en producto que se obtendría cuando no hay crecimiento ni mantenimiento, y los demás términos tienen el significado ya mencionado. Se ha estimado que de la cantidad total de glucosa consumida, el 20% se utiliza en la formación dé biomasa, el 10% para la producción de penicilina, y el resto, o sea el 70% para mantenimiento.

El valor de $Y'_{p/s}$ se puede estimar teóricamente mediante el conocimiento de la ruta biosintética que conduce al producto. En el caso de la penicilina el valor máximo teórico posible ha sido calculado en 1.1 g de penicilina g^{-1} de glucosa

Tomando en cuenta el elevado consumo de glucosa para mantenimiento es evidente que deben realizarse todavía estudios fisiológicos con el objeto de reducir ese porcentaje.

En 1980 la producción mundial de penicilina alcanzó las 17,000 toneladas con un valor estimativo de 380 millones de dólares. Estos dos valores son mayores que los de cualquier otro antibiótico y no son fijos sino que la producción tiene una significativa velocidad de crecimiento anual. Esto se debe a su baja toxicidad y la posibilidad de modificar químicamente la molécula, lo cual incrementa su utilidad.

A pesar de los avances logrados, muchos problemas fundamentales sobre el control de la fermentación de penicilina permanecen todavía sin resolver. Las futuras mejoras en la producción deberían considerar:

El aumento de q_p max y la biomasa (X), la disminución de u_c, la inhibición de la hidrólisis de la penicilina, la disminución de la viscosidad de los caldos y del porcentaje de carbono destinado a mantenimiento, la obtención de cepas con fenotipos y productividad estables, y finalmente el mejoramiento de los sistemas de operación como el batch alimentado y el continuo.

Lecturas recomendadas:

1. *Comprehensive Biotechnology. The practice of Biotechnology:* Current Commodity Products, Vol. 3. Ed. Harvey W, Blanch; Stephen Drew, Daniel C. Wang. Pergamon Press, 1985.
2. *Microbial Growth. Benchmark Papers in Microbiology.* Ed, P.S.S. Dawxon. Dowden, Hutchinson-Ross, Inc. Pennsylvania, 1974.
3. *Microbial Technology. Microbial Processes.* Second Edition/Volume I. Ed. H.J. Peppler and D. Perlman. Academic Press, N. Y., 1979.

Capítulo 10

TRATAMIENTO DE EFLUENTES

El problema de los efluentes industriales y cloacales está íntimamente relacionado con la contaminación ambiental, ya que constituye una de sus causas. La denominación de efluentes industriales se aplica a un conjunto muy variado de residuos que se obtienen como consecuencia de la actividad industrial.

Con el aumento de la población y las necesidades creadas se fueron multiplicando los problemas que ocasionan los residuos generales, que lógicamente van en aumento con aquélla. No solo es el incremento lógico de las aguas cloacales si no también de los residuos industriales, que puede decirse son el castigo pagado por una nación industrializada y la consecuencia de la civilización y su demanda por una alto standard de vida. Esto no es, por supuesto, un argumento contra la industrialización, sino una consecuencia obligada de ella que hay que reconocer, y que fundamentalmente proviene de la falta de previsión al no incluir en las inversiones iniciales la planta de tratamiento de efluentes.

Las industrias pueden generar residuos líquidos, sólidos o gaseosos. Aunque estos últimos ocasionan problemas graves como es el caso de gases muy tóxicos como el anhídrido sulfuroso o el ácido cianhídrico, los efluentes líquidos y sólidos son los que tienen mayor interés para la Microbiología Industrial, dadas las posibilidades que ofrecen los métodos biológicos para el tratamiento o aprovechamiento de los mismos.

Aunque existe una diferencia importante entre las aguas cloacales y los efluentes líquidos de la industria, el enfoque del problema es similar, ya que es necesario en ambos casos reducir a límites bien determinados el contenido de materia orgánica de los mismos antes de que esos líquidos puedan ser arrojados a una corriente de agua.

Las aguas cloacales o efluentes domiciliarios están constituidos por una mezcla muy variada de sustancias y de microorganismos.

Los efluentes industriales líquidos difieren de las aguas cloacales en que generalmente contienen muy pocos microorganismos y un número limitado de sustratos o a veces uno solo. Las diferencias de poder contaminante entre un efluente industrial y una agua cloacal, que están directamente relacionadas con el contenido de materia orgánica que es medido generalmente en términos de demanda de oxígeno biológica (DBO) o química (DQO), pueden ser muy considerables. Si comparamos valores conocidos de algunos efluentes, como una vinaza de destilería, suero de queserías o alpechín (un residuo de la industria del aceite de oliva) que presentan valores de DQO de 70,000, 35,000 y 150,000 mg l^{-1} respectivamente, con las aguas cloacales que suelen tener valores de 120 a 300 mg 1^{-1} puede visualizarse la magnitud del problema que presentan algunos efluentes de la industria para su tratamiento.

En base a la cantidad de materia orgánica que se desecha, es interesante comparar el poder contaminante de una industria con el de una población en valores de número de habitantes equivalentes. Considerando que el poder contaminante de un habitante es de 70 g por día de DBO, y tomando como ejemplo un efluente que tenga 35 g 1^{-1} de DBO como el suero de queso, con un volumen diario de ese efluente en una fábrica de queso de 1,000.000 litros, decimos que el

grado de contaminación equivale a una población de 500,000 habitantes, lo que da una idea muy clara de la magnitud de la contaminación ambiental que puede producir una sola fábrica si no se utiliza ese efluente.

Las soluciones que pueden aplicarse para resolver el problema de la contaminación ambiental derivados de los efluentes industriales, que son los más perjudiciales, pueden ser: 1) Modificación de operaciones y procesos en las plantas industriales, compatibles con la producción y calidad de los productos a obtener, con el objeto de disminuir o minimizar los volúmenes de los efluentes o la concentración de materia orgánica en las descargas. 2) Tratamiento de los efluentes por métodos físicos, químicos y biológicos, con el fin de reducir la DBO de los mismos hasta los límites fijados por las reglamentaciones vigentes. 3) Aprovechamiento integral o parcial de los efluentes para recuperar productos valiosos, que ofrezcan alguna rentabilidad interesante. Como la primera solución no corresponde por lo general al campo de la Microbiología Industrial, trataremos solamente los aspectos relacionados con las otras dos en relación con los métodos biológicos.

Para tal fin, es conveniente considerar primero los aspectos fundamentales del tema para desarrollar después los métodos de tratamiento, la metodología para determinar la calidad del efluente, los métodos de aprovechamiento, y finalmente la estrategia general para encarar el problema de la contaminación.

Aspectos fundamentales del tratamiento de efluentes

Dada la complejidad que presentan muchos efluentes por su composición química y la presencia de organismos diversos en la mayor parte de los casos, es conveniente para el estudio racional del tratamiento considerar varios aspectos fundamentales como ser: a) Interacciones microbianas; b) Reacciones biológicas fundamentales; c) Estequiometría; y d) Relaciones cinéticas básicas. El conocimiento de estos aspectos en conjunto con la naturaleza de los sustratos presentes en los efluentes contribuyen en forma integrada al mejor diseñó del proceso y operación de los distintos tipos de tratamiento.

Interacciones misrobianas

Como ya se dijo, el objetivo primario del tratamiento de un efluente es eliminar la materia orgánica presente y esto se logra facilitando el desarrollo, en condiciones naturales, de poblaciones microbianas y no un microorganismo en especial. Aunque existe la posibilidad de una siembra seleccionada en ciertos casos de tratamientos, se debe considerar casi siempre que existen poblaciones mixtas o poblaciones microbianas heterogéneas que son términos equivalentes. Las poblaciones microbianas son usualmente una mezcla muy compleja de diferentes géneros y especies de bacterias, hongos y protozoarios. La concentración de los componentes biológicos de estas poblaciones está lejos de ser constante, ya que hay fluctuaciones en el tiempo que pueden ser muy drásticas. Aunque los procesos de tratamiento biológicos pueden tolerar ciertas variaciones existen límites a las mismas que producen fracasos en el proceso cuando son excedidas.

Las principales interacciones que ocurren entre las diversas especies microbianas son: 1) Competición, que se refiere, como el nombre lo indica, a una competencia en el uso de un determinado nutriente. 2) Predación, que ocurre cuando un organismo se alimenta de otro, cuando uno ingiere a otro como sucede en el caso de una ameba o un protozoario que ingiere a células de levaduras o de algas.

3) Parasitismo, cuando uno se aprovecha o vive a expensas de otro que generalmente muere. 4) Comensalismo, cuando dos organismos viven simultáneamente sin beneficiarse ni molestarse. 5) Mutualismo, cuando dos organismos se benefician mutuamente, y 6) Amensalismo, que se refiere al caso de la excreción de un factor, por parte de un organismo, que es dañino para el otro, como es el caso de la formación de un antibiótico por un hongo que inhibe el desarrollo de una bacteria.

Estudios a nivel de laboratorio de cultivos mixtos de Saccharomyces cerevisiae, Proteus vulgaris y Bacillus polymixa han demostrado que presentan 3 tipos de interacción simultánea con mutualismo y amensalismo entre las 2 especies de bacterias y también comensalismo entre la levadura que libera niacina y biotina y las especies bacterianas. Cuando al sistema se agrega una ameba, la Dictytostelium discoideum, tiene lugar también predación por parte de esta última. Este estudio experimental revela la complejidad que pueden presentar las interacciones biológicas en un proceso de tratamiento y la necesidad que existe del conocimiento de las mismas para un mejor control de dicho proceso.

Reacciones biológicas

Las reacciones biológicas más importantes son aerobias, anaerobias o fotosintéticas. En la Figura 27 se observa un esquema general de las actividades de síntesis y respiración que se producen por las actividades biológicas.

Como se muestra en la figura hay fuentes nutritivas necesarias como C, O_2, H_2, N_2, P , ya sea como orgánicas o inorgánicas que deben ser transportadas a la célula en forma soluble.

La energía debe suministrarse como energía contenida en compuestos orgánicos o como energía radiante de la luz solar. Una fracción de la energía es usada para la biosíntesis de biomasa y la restante es dispersada como calor.

Los microorganismos producen también productos de desecho que dependen de las especies consideradas y las condiciones ambientales. Los productos más deseables son gases como CO_2, N_2, O_2 y CH_4, que pueden ser fácilmente separados de la fase líquida. Otros gases como H_2S NH_3 y aminas son indeseables. Un requerimiento importante para la mayor parte de los procesos biológicos usados en el tratamiento de efluentes es la producción de microorganismos floculantes, que pueden ser fácilmente separados por medios físicos como sedimentación por gravedad, centrifugación o filtración. Desde el punto de vista de la polución el microorganismo debe considerarse como un producto no deseable. La facilidad de separación y la destrucción por autooxidación son también aspectos de gran importancia.

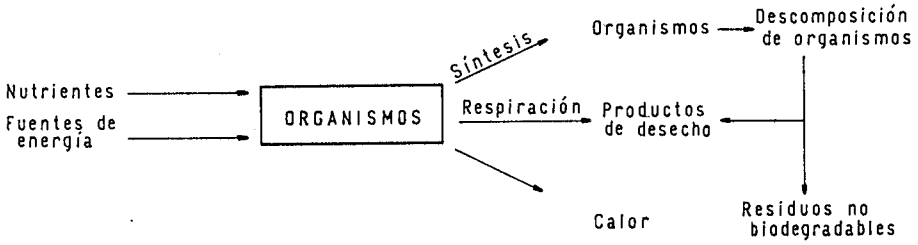


Figura 27. Reacciones biológicas fundamentales.

Las reacciones biológicas pueden influenciar las reacciones químicas en la fase líquida del medio ambiente. Por ejemplo el consumo de $C0_2$ por las algas durante el día puede aumentar el pH y esto ocasiona la fijación del SH_2 como sulfuro.

Estequiometría

La estequiometría de las reacciones involucradas en los distintos tipos de tratamiento es altamente influenciada por las especies de microorganismos presentes, los compuestos existentes y las condiciones ambientales impuestas sobre el proceso. Las reacciones típicas son como sigue:

Aerobias: Materia orgánica $\xrightarrow{\text{Mic. aerobios}}$ Microorganismos aerobios + $CO_2 + H_2O$ (1)

Anaerobias: Materia orgánica $\xrightarrow{\text{Mic. anaerobios}}$ Microorganismos anaerobios + $CO_2 + CH_4 + H_2O$ (2)

Fotosíntesis: $CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Organism. fotosint.}}$ Organismos fotosint. + O_2 (3)

Estas reacciones pueden ocurrir al mismo tiempo, por ejemplo en una laguna: fotosíntesis en la parte superior, aerobiosis en la parte media y anaerobiosis en la inferior. Un inconveniente de las reacciones fotosintéticas es que el C inorgánico (CO_2) es convertido en C orgánico, que es un agente de polución .

Se pueden considerar ecuaciones de balance efectuando, un análisis elemental en el sistema orgánico y en el microorganismo producido. Un ejemplo para un proceso aerobio es dado abajo, en el cual el sustrato orgánico se considera que tiene la misma composición que la glucosa y el microorganismo la fórmula $C_5H_7NO_2$. Las reacciones biológicas serían:

Respiración: $C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ (4)

y Síntesis: $5\,C_6H_{12}O_6 + 6\,NH_4^+ \longrightarrow 6\,C_5H_7NO_2 + 18\,H_2O + 6\,H^+$ (5)

Si se considera un coeficiente de rendimiento de 0.5 moles de microorganismo por mol de glucosa tendremos:

$C_6H_{12}O_6 + 0.5\,NH_4^+ + 3.5\,O_2 \longrightarrow 0.5\,C_5H_7NO_2 + 3.5\,CO_2 + 5\,H_2O + 0.5\,H^+$ (6)

Dado que el tiempo de residencia de los organismos en los procesos biológicos es suficientemente largo es necesario considerar también una reacción de autooxidación o descomposición que no se considera nunca en procesos de fermentación normales.

$$C_5H_7NO_2 + H^+ + 5\,O_2 \longrightarrow 5\,CO_2 + NH_4^+ + 2\,H_2O \qquad (7)$$

Todas las reacciones son exotérmicas, pudiéndose calcular el calor liberado por las reacciones netas o por la muerte del organismo en base a los calores de combustión de los productos y reactantes. El cálculo del calor liberado es importante en los procesos de compost y digestión aerobia termofilica, en los cuales la concentración de materia destruída es suficientemente alta para que el calor liberado haga aumentarla temperatura.

Como ya vimos la relación estequiométrica entre el sustrato orgánico consumido y el microorganismo producido se expresa como un coeficiente de rendimiento

$$\frac{dX}{dt} = -Y_{x/s}\,\frac{ds}{dt} \quad \text{ó sea} \qquad (8)$$

$$Y_{x/s} = -\frac{dX}{ds}$$

La aplicación de esta ecuación en tratamiento de efluentes se complica porque el sustrato es generalmente una mezcla compleja de compuestos orgánicos solubles e insolubles y la concentración microbiana es difícil de medir. La DBO o DQO son comunmente usadas como una medida de la concentración del sustrato.

Una ventaja de los procesos anaerobios sobre los aerobios es que $Y_{x/s}$ es menor para los anaerobios, lo que resulta en una producción menor de desechos.

Relaciones cinéticas básicas

Se utilizan las expresiones fundamentales ya consideradas anteriormente:

$$1)\ r_x = \mu X \qquad (9)$$

$$2)\ \mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \qquad (10)$$

Esta relación es muy usada, aunque debe reconocerse que existen otros factores, además de una concentración limitante. La fuente de C y energía, medida como DBO o DQO es generalmente considerada el sustrato limitante en los procesos biológicos aerobios. Sin embargo, es bien conocido que la velocidad de crecimiento de microorganismo puede ser controlada por otras sustancias como amoníaco, fosfatos, sulfatos, sales de hierro, $C0_2$, etc. El control (sustrato limitante) por amoníaco o fosfatos puede ser de especial importancia en el tratamiento de residuos industriales deficientes en estas sustancias. El crecimiento de algas en procesos fotosintéticos puede ser controlado por la luz o $C0_2$, entre otras sustancias.

El control puede ser ejercido por la transferencia de masa al interior de la célula, lo mismo que por la reacción química dentro de la misma, y en baja concentración de sustrato ambas pueden ser de importancia. Varios autores han demostrado la significación de la transferencia de materia en proceso biológicos para tratamiento de efluentes. La ecuación (10) puede ser usada si K_s es considerada

una variable dependiente del grado de mezclado. La importancia de transferencia de masa en estos procesos está reflejada en el hecho de que los valores de K_s son comunmente de un orden de magnitud mayor que para cultivos puros de microorganismos. El tamaño de los flóculos o el espesor del film en estos procesos está medido en milímetros, lo que en microorganismos individuales se mide en micrones.

En la mayor parte de los procesos usados en tratamiento de efluentes, los microorganismos son retenidos en el reactor suficiente tiempo como para que la autooxidación o la descomposición de microorganismos sea importante, de manera tal que el proceso de digestión aerobia es diseñado para que la destrucción del microorganismo sea la reacción clave. La ecuación (9) puede ser modificada para incorporar ese aspecto:

$$r_x = (\mu - Kd)\ X \qquad (11)$$

Kd = velocidad específica de descomposición del organismo

Kd es usado en el sentido de un término que incluye el efecto de todos los factores, aparte del sustrato, que puede resultar en un cambio de la masa de los organismos involucrados. Entre esos factores están el metabolismo endógeno, la muerte con lisis consiguiente y el crecimiento críptico. El valor de Kd, que es generalmente sin importancia en experimentos cortos de interés microbiológicos, es sin embargo de gran significado en los procesos biológicos largos. Comunmente usado en procesos biológicos de tratamiento de efluentes, Kd no es realmente una constante, ya que decrece con la edad del organismo. Sin embargo, el concepto de un valor constante de Kd ha sido postulado como muy satisfactorio cuando se aplica en un rango limitado de edades.

Diferencias entre tratamiento biológico de efluentes y procesos de fermentación

Es interesante comparar los procesos de tratamiento con los procesos de fermentación que se utilizan en Microbiología Industrial. En la tabla 6 se observan las principales diferencias y semejanzas.

Considerando estas diferencias y las dificultades que existen para mantener el estado estacionario en un sistema continuo de tratamiento de efluentes se puede cuestionar si es realmente posible esperar una real cuantificación aplicable a estos procesos.

Aunque la presencia de poblaciones mixtas representa una variación interna intrínseca y las dificultades de control que se presentan son importantes, la situación no es tan caótica como puede suponerse, ya que existen muchas publicaciones en las cuales se demuestra que los fundamentos de la estequiometría y cinética microbiana pueden aplicarse con éxito al diseño de procesos y reactores para tratamiento de efluentes.

Métodos de tratamiento

Los sistemas biológicos utilizados a nivel industrial que se aplican por lo general como tratamiento secundario pueden ser de tipo aerobio y anaerobio. Entre

Tabla 6. Diferencias y semejanzas entre tratamientos biológicos y procesos microbianos.

	Tratamiento biológico	**Procesos microbianos**
Sustratos	No es posible seleccionarlo, cualquiera está presente	Seleccionado
Medio de cultivo	Sólo se pueden agregar algunas sales (N y P)	Predeterminado
Microorganismo	Poblaciones mixtas no seleccionadas	Cultivo único seleccionado
Sustancias tóxicas	Pueden estar presentes	No están presentes Son excluídas
pH	Poco o nada controlado	Generalmente controlado
Temperatura	No controlada	Controlada
Tipo de reactores	Abiertos a la intemperie	Rara vez a la intemperie
Esterilización	Nunca practicada	Casi siempre necesaria
Principios de aireación y agitación	Similares	
Cinética de crecimiento	Similares	

los procedimientos aeróbicos existe una diversidad de tecnologías disponibles tales como: 1) Barros activados. en el cual los materiales solubles coloidales y en suspensión son transformados en CO_2, H_2O y células con recirculación de los barros formados. 2) Lagunas de aireación que emplean aireación artificial en una laguna y que puede ser completa o parcialmente aerobia. 3) Filtros percoladores que consisten en lechos de material de tamaño variable o sintético que por acción del tratamiento lleva adherido un limo formado por el material biológico a través del cual el efluente fluye. 4) Discos rotatorios, que constituyen una modificación de los sistemas de filtración fija y consisten en discos rotantes que van montados en un eje horizontal. 5) Piletas de estabilización que son sistemas de bajo costo que utilizan bacterias y algas para reducir los componente orgánicos y eliminar los microorganismos patógenos.

Los procesos anaeróbicos son fundamentalmente procesos de digestión que pueden aplicarse a residuos líquidos o sólidos e incluyen generalmente separación y aprovechamiento del gas producido. La transformación de la materia orgánica en metano y CO_2 se lleva a cabo en 3 etapas consecutiva en las cuales intervienen diferentes grupos de bacterias con formación de ácido acético, propiónico, butírico, láctico, fórmico, CO_2 e H_2 para llegar finalmente a metano y $C0_2$. Los digestores anaerobios varían mucho en relación a la complejidad y diseño y se ha demostrado que un solo diseño no es adecuado para distintos efluentes. Además de los digestores tradicionales se han desarrollado últimamente nuevos tipos de reactores a lecho fluidizado y otros basados en filtros anaerobios.

Cuando se comparan procesos aerobios con anaerobios se suele enfatizar que existe una marcada preferencia por el uso de procedimientos anaerobios debido fundamentalmente a la economía de energía lograda, dado que los costos de operación de los sistemas aerobios son cada vez más elevados. Sin embargo, la com-

paración debe hacerse en forma más completa. Por ejemplo, debe tenerse en cuenta la presencia de compuestos tóxicos (como el fenol) o de los llamados recalcitrantes o xenobióticos, que son aquellos cuya biodegradabilidad es muy dificultosa. Existen tres factores fundamentales para determinar la capacidad de un tratamiento biológico de efluentes que contengan compuestos tóxicos o recalcitrantes. Esos factores son: 1) La naturaleza de la conversión química necesaria. Por ejemplo los derivados halogenados aromáticos son más fácilmente atacados por comunidades anaeróbicas, mientras que en el caso de comunidades aeróbicas los compuestos tienden a polimerizarse primero, haciéndose más difícilmente atacables después. 2) La ecofisiología de los microorganismos comprendidos. La digestión anaeróbica puede considerarse como un proceso en serie y es por lo tanto más vulnerable que la aeróbica que comprende microorganismos y caminos metabólicos que actúan en paralelo. Una variedad de compuestos como amoníaco, agua oxigenada, sulfitos, sulfatos e hidrógeno sulfurado, que no interfieren en tratamientos aerobios pueden ser inhibidores de las bacterias metanogénicas. 3) Diseño del proceso y operación de la planta. A pesar de que existen procesos aerobios muy difundidos y eficientes para tratamiento de aguas residuales que contienen fenoles, amoníaco y cianuros, se ha demostrado recientemente que también pueden tratarse anaeróbicamente con reactores de filtro, empleando carbón activo, lo cual demuestra la importancia del adecuado diseño del proceso. La tendencia moderna considera que los sistemas son, más que excluyentes, complementarios, ya que las comunidades misrobianas anaeróbicas son específicamente ventajosas a altas temperaturas y altas concentraciones de sustratos, especialmente insolubles, mientras que las comunidades microbiológicas aeróbicas son indispensables para bajos niveles de sustratos, condiciones ambientales variables y distintos productos químicos.

Metodología para la determinación de la calidad de un efluente

Son fundamentalmente dos las técnicas de medida que se utilizan para determinar la calidad de un efluente: 1) DBO, o sea la demanda biológica de $0_{2,}$ y 2) la demanda química, que puede determinarse por el valor de $KMn0_4$ o por el $Cr_20_7K_{2,}$ que es el que más se utiliza como demanda química y se lo simplifica como DQO.

El ensayo de DBO es un intento de simular las condiciones de una corriente de H_2O. Una muestra del efluente es diluída con H_2O aereada y la concentración de 0_2 es determinada antes y después de 5 días de incubación a 20 °C. El ensayo es simple, pero se requiere: a) Si la muestra no puede ser medida inmediatamente debe conservarse a 5 °C. b) La dilución debe ser tal que por lo menos 30% del O_2 disponible debe estar presente en el ensayo después de 5 días de incubación. c) Las botella deben tener una capacidad de 250 ml. d) La temperatura de incubación debe ser 20 °C ± 0,5 °C durante 120 h. Las botellas deben conservarse en la oscuridad y e) El valor de pH debe estar entre 6.5 - 8.2.

El valor de $KMnO_4$ es un ensayo empírico de las sustancias oxidables químicamente empleando una solución de $KMnO_4$ N/80.

La demanda química es el valor de 0_2 absorbido por un litro de muestra cuando una alícuota de la muestra es calentada a reflujo durante 2 horas con solución de $Cr_2O_7K_2$. En la tabla 7 se dan algunos valores de las demandas biológicas y químicas de algunos efluentes.

Tabla 7. Valores de demanda biológica (DBO), valor de permanganato (VP) y demanda química (DQO), expresados en mg l^{-1}, de varios efluentes.

Efluente	DBO	VP	DQO
Azúcar de remolacha	850	80	1,150
Efluente doméstico	350	100	300
Lavado de ropas	1,600	170	2,700
Almidón de harina	12,000	3,600	17,150

Aprovechamiento total o parcial de efluentes

El aprovechamiento o la valorización más conveniente de un efluente por vía microbiana depende del producto a ser obtenido o más precisamente de las aplicaciones y aceptación por parte del mercado de ese producto. Por acción de los microorganismos sobre la materia orgánica puede obtenerse: a) Energía a partir de residuos sólidos o líquidos, como es el caso del metano, b) Fertilizantes o condicionadores del suelo, a partir de residuos sólidos, c) Alimentos de tipo no convencional, como proteínas unicelulares, y d) Metabolitos específicos, como alcohol, enzimas, etc. Un ejemplo interesante de empleo de efluentes como sustrato para la industria es la producción de enzimas como lactasa o proteasas o goma xantano a partir de suero de queserías. A medida que pasamos de una aplicación a otra aumenta la valorización del efluente como materia prima de los procesos involucrados, pero aumenta también la complejidad de las operaciones. En el caso de metabolitos específicos suele ser muy dificultosa la utilización de efluentes como sustratos de las industrias fermentativas por la diversidad de las etapas de extracción y purificación (salvo en algunas excepciones) que son necesarias de efectuar. A veces sucede también en muchos casos que los efluentes son estacionales, no existiendo por lo tanto la disponibilidad permanente que la industria necesita. Otro problema está relacionado con las variaciones en la composición de los efluentes, lo que hace muy difícil su aceptación por parte de la industria.

En el caso de los residuos sólidos es esencial pensar en la recuperación de la materia orgánica, ya sea incorporando el efluente al suelo o empleándolo para la producción de energía no convencional (por ejemplo metano) o destinarlo a la producción de un alimento. No deberían quemarse los residuos aunque esto se hace aún en gran escala, como es el caso del bagazo en algunos ingenios azucareros. No es tan simple evitar esto, porque los ingenios logran en esa forma una economía considerable de combustibles. Lo importante en este caso es el desarrollo de tecnologías que otorguen al bagazo una valoración superior a la que puede tener como combustible y que además puedan absorber las grandes cantidades de ese residuo. Cuando se trata de efluentes líquidos pueden existir dos posibilidades según la concentración de la materia orgánica: 1) Efluentes con alta concentración (3% o más) como el agua de procesamiento de papas, vinazas de destilería, suero de queso, etc.. Estos efluentes pueden ser usados como materia prima de procesos fermentativos para la obtención de alimentos de tipo no convencional, pero debe tenerse en cuenta que esos procesos generan casi siempre otro efluente que necesita de una segunda etapa de tratamiento. 2) Efluentes con baja concentración de materia orgánica. Son más difíciles de aprovechar por la dilución de la materia orgánica que presentan, y por los bajos rendimientos de los producto obtenidos. Se puede, sin embargo, en algunos de estos casos aplicar un procedimiento microbiológico con retroalimentación.

Estrategia general para encarar el problema de los efluentes

Es evidente que la calidad de vida de la población está muy influenciada por la contaminación producida por los residuos o efluentes industriales, gases, líquidos o sólidos, que son la principal causa del deterioro que se observa en el medio ambiente.

En muchos países existen plantas en funcionamiento que son muy poco eficientes, y que en algunos casos se pueden mejorar con modificaciones poco costosas. Un problema generalizado está relacionado con el empleo de plantas para el tratamiento de un volumen de efluentes mucho mayor con respecto al que originalmente se tuvo en cuenta. Además existe el criterio generalizado y erróneo de creer que una planta de tratamiento no necesita supervisión profesional y que puede recibir cualquier tipo o mezclas diversas de efluentes sin tener en cuenta la flora microbiana que está involucrada.

Lo primero que debe hacerse, como ya se dijo, es comprobar realmente si el efluente no se puede disminuir o incluso eliminar, para lo cual es necesario estudiar las operaciones y procesos industriales involucrados. En el caso de plantas de procesamiento de pollos, por ejemplo, es común comprobar que las vísceras y sangre de los animales son arrastrados con grandes volúmenes de agua, lo que ocasiona efluentes muy contaminados, cuyo tratamiento es muy costoso. Pueden en ese caso considerarse otras alternativas de separación de los residuos sólidos con modificaciones menores en el proceso y reducir así el problema.

El paso siguiente consiste en considerar el aprovechamiento, si es posible, total, del efluente considerado. Tal es el caso de la utilización de suero de queso para producción de proteínas unicelulares cultivando cepas de levaduras, que incluye el secado total del caldo fermentado. Los residuos sólidos de naturaleza orgánica, por ejemplo, pueden ser transformados en acondicionadores de suelos o para rellenar terrenos bajos. Finalmente, es fundamental que exista la obligación de incluir en las nuevas plantas industriales a instalar planta de tratamiento adecuadamente diseñadas.

Las soluciones a encarar no son simples y dependen de acciones globales que deben ser encaradas y coordinadas por los gobiernos y empresas con la colaboración de todos los demás sectores involucrados.

Lecturas recomendadas:

1. *Biotechnology and Bioengineering Symposium N° 2. Biological Waste Treatntent.* Ed. Raymond Canale. John Wiley and Sons *(1971).*
2. *Poceedings 4th European Congress on Biotechnology. Vol. 4.* Ed. 0, M. Neijssel, R. van der Meer y K. Luyben Elsevier *(1987).*

Capítulo 11

POSIBILIDADES FUTURAS

Como ya se vio en la Introducción de esta monografía el empleo de microorganismos para la producción de bienes y servicios tuvo etapas de estancamiento y de renovado interés. En el momento actual se puede asegurar un futuro muy promisorio para la Microbiología Industrial por diversas razones, entre las cuales se pueden mencionar: 1) Utilización de nuevas cepas. 2) Empleo de materias primas no tradicionales. 3) Producción de nuevos metabolitos. 4) Posibilidad de competir con la vía petroquímica en la producción de compuestos simples. 5) Alta especificidad de algunas transformaciones microbiológicas. 6) Sistemas de producción no tradicionales. 7) Sistemas no convencionales de tratamiento de efluentes. 8) Empleo de las metodologías tecnológicas en los cultivos de células animales y vegetales.

La utilización de nuevas cepas ofrece un campo notable en expansión para los procesos microbiológicos, ya que hasta el presente se han empleado sólo unos pocos microorganismos de la gran diversidad que existen para ser explotados con fines industriales. Nuevos géneros y especies se están incorporando permanentemente para su empleo en la producción de compuestos conocidos o para nuevos productos. Especies del género *Actinoplanes*, por ejemplo, son importantes en la producción de algunos inhibidores enzimáticos, lo mismo que especies del género *Therinocellum* que permiten la transformación directa de la celulosa en alcohol.

Por otra parte las necesidades de mejorar los rendimientos de procesos conocidos hace necesaria la obtención de nuevos mutantes a partir de las cepas disponibles.

Pero es sin duda en la utilización de cepas obtenidas por ingeniería genética que se esperan los grandes impactos tecnológicos para el futuro. Los logros alcanzados en la producción de insulina, interferón, hormona del crecimiento bovino, vacuna contra hepatitis B, etc., se verán multiplicados en el futuro para la obtención de otros compuestos que ya están siendo estudiados.

Las materias primas tradicionales están siendo complementadas con otras muy abundantes basadas en recursos renovables y que hasta el presente han sido poco o nada aprovechadas como sustratos en procesos de fermentación, como es el caso de los residuos celulósicos, que pueden ser materias primas de muy bajo costo para la producción de alcohol, enzimas y otros productos. También se están ampliando los usos de hidrocarburos como sustrato de procesos como en la producción de ácido cítrico y otros compuestos. La utilización de efluentes industriales de varias agroindustrias como materias primas de costo cero o negativo será sin duda ampliada en el futuro, pues ello representa además una contribución a la eliminación parcial o total de residuos contaminantes.

La producción de nuevos compuestos representa otra posibilidad interesante de los procesos fermentativos. Un ejemplo está constituído por diversos productos que presentan actividad farmacológica como los inhibidores enzimáticos y los antitumorales. Algunos inhibidores enzimáticos han sido ya aceptados en algunos países para su empleo en medicina humana, como la bestatina, un inmunoregulador. Otros productos interesantes en desarrollo son los polímeros biodegradables como el polibetahidroxibutirato, que tiene aplicaciones industriales y medicinales. Algunos pigmentos como los carotenos y las ficobilinas producidas por al-

gunas algas del género *Dunaliella, Spirulina y Nostoc* tienen también un futuro promisorio. Se han mencionado también algunos herbicidas de origen microbiano, que tienen igualmente perspectivas de ser desarrollados.

En varios casos la elección de la vía microbiana es obligada por razones económicas, ya que aunque sea posible producir algunas moléculas por vía química, desde el punto de vista económico esto no resulta rentable, como sucede en el caso de los antibióticos, algunas vitaminas y aminoácidos. Sin embargo los procesos microbiológicos se presentan también como alternativas válidas para el caso de moléculas sencillas como el etanol, el butanol o el ácido láctico, con los cuales existe lógicamente la competencia con los procesos que derivan de la petroquímica. Estos casos están directamente relacionados con el costo del petróleo y sus derivados. El ejemplo del butanol es muy claro es ese sentido, ya que en los últimos años se ha producido un renovado interés en, su producción por fermentación a partir de materias primas de bajo costo o de residuos, ya que en esta forma se pueden desarrollar procesos que son competitivos con los derivados de la petroquímica cuando el valor del petróleo supera un determinado valor crítico.

La alta especificidad de algunas transformaciones microbiológicas permite la posibilidad de efectuar reacciones que son imposibles de realizar por vía química como ocurre en los diversos procesos de producción de compuestos esteroidales. Este campo de aplicación se ha visto enriquecido últimamente, y lo será sin duda mucho más en el futuro, por las grandes posibilidades que ofrece ya la biocatálisis, que está siendo aplicada no sólo en la fase acuosa sino también en presencia de solventes orgánicos para lo obtención de un gran número de compuestos.

Entre los sistemas de producción no tradicionales se incluyen fundamentalmente los procesos en estado sólido y los que emplean microorganismos inmovilizados. En el primer caso es necesario el desarrollo de nuevos reactores y lograr la optimización de los mismos. Estos sistemas permiten prever la producción comercial de nuevos productos como algunas enzimas. El uso de reactores con microorganismos inmovilizados es otro campo de futuro desarrollo de la Microbiología Industrial que ya está siendo aplicado a la producción de alcohol, algunos aminoácidos y otros compuestos.

La Microbiología Industrial ofrece también como hemos visto alternativas interesantes y únicas para resolver problemas de contaminación ambiental, ya sea para el tratamiento convencional de residuos o para el aprovechamiento específico de algunos de ellos, por lo cual es de esperar en el futuro nuevos avances en este campo vinculados a mejoras en el control de los procesos en conjunto con adelantos en los conocimientos básicos y diseño de nuevos reactores. Recientes desarrollos que están siendo investigados y que sin duda tendrán mayor trascendencia en el futuro en esta área están relacionados con el uso de microorganismos para la eliminación de metales pesados y purificación de efluentes gaseosos.

Finalmente las metodologías tecnológicas utilizadas en el desarrollo de procesos de la Microbiología Industrial son ya de gran valor para otro tipo de procesos biotecnológicos como los que se realizan con células animales y vegetales. En este último caso se suele emplear ya el término fitofermentación para referirse a procesos realizados con cultivos de células en suspensión en biorreactores.